

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Bruk av væske-fase mikroekstraksjon i analyse av legemidler og -metabolitter

En litteraturstudie

Hesam Delavari



Faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi,

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2015

Bruk av væske-fase mikroekstraksjon i analyse av legemidler og -metabolitter

En litteraturstudie

Hesam Delavari

Masteroppgave ved faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo i
perioden august 2014 til desember 2015

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Førsteamanuensis Astrid Gjelstad

Hesam Delavari

2015

Bruk av væske-fase mikroekstraksjon i analyse av legemidler og -metabolitter
En litteraturstudie

Hesam Delavari

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil rette en stor takk til min veileder professor Stig Pedersen-Bjergaard for utrolig god veiledning, forståelse og tålmodighet han har vist gjennom hele masteroppgaveskrivingen og for at han alltid var villig til å hjelpe meg med store og små utfordringer.

Jeg vil også takke førsteamanuensis Astrid Gjelstad for gode råd og kommentarer jeg fikk i løpet av skriveprosessen. I tillegg vil jeg takke Olav Arnfinn Søgne for god hjelp og støttet under arbeidet med masteroppgaven.

Jeg vil gjerne takke min kjære kone, Samira for ubetinget kjærighet og støtte i løpet av alle disse årene. Takk til min lille solstråle, Diana som gir meg stor glede, godt humør og livskraft.

Jeg vil gjerne også takke familien min for god støtte og oppmuntring gjennom studietiden.

Lørenskog, desember 2015

Hesam Delavari

Sammendrag

I denne oppgaven ble hullfiber væske-fase mikroekstraksjon ((*hollow fiber liquid-phase microextraction*) (HF-LPME)) studert og flere faktorer som historisk bakgrunn, prinsipper, egenskaper, fordeler, ulemper, kompatibilitet av metoden og dens fremtidsmuligheter ble studert.

Væske-fase mikroekstraksjon er en prøveopparbeidelsesmetode som er videreutviklet fra *single-drop microextraction* (SDME). I SDME vil analytter bli ekstrahert inn i en dråpe av organisk løsningsmiddel som henger fra spissen av en kanyle som ligger inne i prøveløsningen.

I HF-LPME vil analytter av interesse ekstraheres fra en donorfase til et organisk løsningsmiddel plassert i hulrommet til hullfiberen. Denne metoden kalles to-fase HF-LPME. I tre-fase HF-LPME er det organiske løsemiddelet immobilisert i porene til hullfiberen og inne i hulrommet til hullfiberen finnes en vandig akseptorløsning. Analytter vil ekstraheres fra en donorfase over til organisk løsningsmiddel og videre til akseptorløsningen. Prosessen skjer ved å ha forskjellige pH-verdier i donorfase og akseptorløsningen avhengig av egenskapene til analytten.

Siden metoden ble introdusert til i dag har flere forskningsgrupper anvendt metoden for ekstraksjon av legemidler. En tabell ble laget som gir oversikt over ulike legemidler og metabolitter som har blitt ekstrahert ved HF-LPME, hvilken donorfase ble brukt i studien, hvilken teknikk ble brukt for analysen (to-fase eller tre-fase), hvilket organisk løsningsmiddel som ble brukt, hvilke kjemiske egenskaper legemiddelet eller metabolitten har og hvilken akseptorløsning som ble brukt i studien (tre-fase HF-LPME).

Flere artikler hvor HF-LPME ble brukt som ekstraksjonsmetode ble gjennomgått. Studier hvor basiske legemidler, sure legemidler, enantiomere legemidler, planteekstrakter og polare stoffer ble ekstrahert ved HF-LPME ble utdypet. Studier hvor HF-LPME ble brukt i kombinasjon med GC, ioniske væsker ble brukt i HF-LPME, HF-LPME ble forsøkt automatisert, strøm ble brukt som drivkraft, HF-LPME ble brukt i farmakokinetiske studier, HF-LPME i kombinasjon med derivatisering og bruk av ultralyd for å forbedre utbytte blir detaljert beskrevet.

Det er foreslått flere metoder for å forbedre eller automatisere hullfiber væske-fase mikroekstraksjon. HF-LPME i kombinasjon med DESI-MS (*desorption electrospray ionization mass spectrometry*), mikrofluid-chip basert HF-LPME og *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) er mulige fremtidige retninger for HF-LPME.

I HF-LPME-DESI-MS ble metoden for første gang brukt for deteksjon og analyse av basiske stoffer fra urin. Basiske legemidler som difenhydramin, petidin, nortriptylin og metadon ble brukt som modellsubstanser for studien og massespektrometeret ble operert i full skann modus.

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AP	Akseptorfase
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
BTEX	Benzen, toluen, etylbenzen, o-oksylen
CD	Cyklodekstriner
CE	Kapillærelektroforese
CIT	Citalopram
cm	Centimeter
DAD	Diod array detector
DCIT	Desmetylcitalopram
DESI	desorption electrospray ionization
DHE	Dihydro ergotamin
DI-HF-LPME	Direct immersed-HF-LPME
DIC	Diklofenak
DP	Donorfase
ECH	Echinakosider
ED	Elektrokjemisk deteksjon
EME	Elektromembran ekstraksjon
EMI	Elektromembran ionisasjon
ESI	Electrospray ionisation
FIA	Flow-injection analysis
FID	Flamme ioniserings deteksjon
FLD	Fluorescence detector
GC	Gasskromatografi
H-U-HF-LPME	High- throughput ultrasonication enhanced HF-LPME
HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
HF-LPME	Hollow fiber liquid-phase microextraction
HPLC	Væskeskromatografi
HS-HF-LPME	Static headspace-HF-LPME
i.d.	Indre diameter
i.s.	Intern standard

IBU	Ibuprofen
KH ₂ PO ₄	Monokaliumfostfat
KHz	Kilo hertz
L	Liter
LLE	Væske-væske-ekstraksjon
LLOQ	Kvantifiseringsgrensen
LOD	Deteksjonsgrense
HF-LPME	Hullfiber Væskefase mikroekstraksjon
M	Molar
m/z	Masse over ladning (mass to charge ratio)
MBDB	<i>n</i> -methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine
MDA	3,4-methylenedioxyamphetamine
MDEA	3,4-methylenedioxyethylamphetamine
MDMA	3,4-methylenedioxymethamphetamine
mg	Milligram
MH	Metformin hydroklorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Massespektrometri
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
PALME	Parallel artificial liquid membrane extraction
PFBC	Pentaflourbenzoyl klorid
Psi	Pund per kvadrattomme
rpm	Rotasjoner per minutt
RSD	Relativ standardavvik
s	Sekund
SAC	Acetylsalisylsyre
SD	Sulfadiazin
SDM	Sulfadimetoksin

SDME	Single-drop microextraction
SLM	Supported liquid membrane
SM ₁	Sulfamerazin
SM ₂	Sulfametazin
SMZ	Sulfametoksazol
SPME	Fast-fase mikroekstraksjon
TEHP	Tris(2-etylheksyl)fosfat
THF	Tetrahydrofuran
TOPO	Tri-n-octylphosphine oxide
UV	Ultrafiolett
V	Volt
VA	Valirinic acid
W	Watt
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Innholdsfortegnelse

1 Innledning	1
1.1 Introduksjon	1
1.2 Historisk bakgrunn	1
1.3 Prinsipp	4
1.4 Fordeler og ulemper ved HF-LPME	6
2 Hensikt	8
3 Metode	9
3.1 Litteraturstudie som metode	9
3.2 Kriterier for valg av artikler	10
4 Resultater	11
4.1 Forskning, utbredelse og relevante studier	11
4.1.1 HF-LPME og basiske legemidler	11
4.1.2 HF-LPME og stereoselektiv analyse	14
4.1.3 HF-LPME og gasskromatografi	16
4.1.4 HF-LPME og planteekstrakter	19
4.1.5 HF-LPME og sure legemidler	21
4.1.6 HF-LPME og polare stoffer	22
4.1.7 HF-LPME og automatisering	25
4.1.8 HF-LPME og ioniske væsker	32
4.1.9 Spenning som drivkraft i HF-LPME	35
4.1.10 HF-LPME i farmakokinetiske studier	37
4.1.11 HF-LPME kombinert med derivatisering	40
4.1.12 Kan ultralyd forbedre HF-LPME utbytte?	44
4.2 Tabell	49
4.3 Utvikling og framtidsutsikt	59
5 Diskusjon	63
6 Konklusjon	65
Referanseliste	66

1 Innledning

1.1 Introduksjon

Væske-fase mikroekstraksjon (*Liquid-Phase Microextraction*, LPME) er en prøveopparbeidelsesmetode som er videreutviklet fra *single-drop microextraction* (SDME). SDME metoden ble for første gang introdusert i 1996 [1]. I denne metoden vil analyttene av interesse bli ekstrahert fra en vandig prøveløsning inn i en dråpe av organisk løsemiddel som er plassert i den vandige løsningen. Ekstraksjonsprosessen benytter seg av passiv diffusjon og man rister prøveløsningen under hele prosessen. Dråpen er hengende fra spissen av en mikrosprøytes nål, og etter at ekstraksjonsprosessen er over vil man bruke dråpen videre til analysen som vanligvis skjer ved hjelp av gasskromatografi (GC). Alternativet er at analytter i sin nøytrale form blir ekstrahert fra vandig prøveløsning gjennom et tynt lag av organisk løsningsmiddel som ligger på toppen av prøveløsningen og inn i en vandig mikro-dråpe som er plassert på spissen av mikrosprøyten [2]. Til slutt vil man ved hjelp av pH-endring ionisere analytten slik at det kan brukes i HPLC for videre analyse [2].

En ulempe ved metoden er at dråpen har lav mekanisk stabilitet og det er lett for at man mister dråpen inn i den vandige løsningen [3].

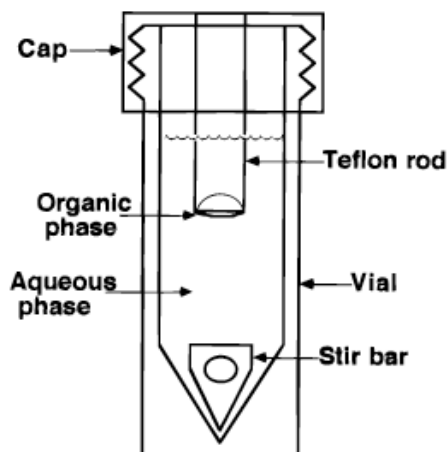
1.2 Historisk bakgrunn

HF-LPME har sine røtter i den tradisjonelle metoden væske-væske ekstraksjon (LLE). Metoden bruker ganske enkel kjemi for å separere stoffer fra prøveløsningen videre inn i en annen løsning som kan analyseres [4]. Organiske stoffer kan fordele seg mellom to ikke blandbare væsker. Disse er som regel en vandig løsning og et organisk løsemiddel som ikke skal være blandbart med vann siden prøveløsningen vanligvis er en vandig løsning og stoffer av interesse skal ekstraheres over til den organiske løsningen. Valg av organisk løsemiddel er viktig for ekstraksjonen. Dette er for å få et høyt og tilfredsstillende ekstraksjonsutbytte. Valgt løsemiddel skal være et godt løsemiddel for stoffet vi er interessert i og samtidig et dårlig løsemiddel for andre uønskede stoffer [4]. Fordelingskoeffisienten og fordelingsforholdet er spesielt viktig når man undersøker et stoffs evne til å fordele seg mellom de to ikke blandbare væsker. Fordelingskoeffisienten beskriver hvordan et stoff fordeler seg mellom to ikke blandbare løsemidler og er et mål for stoffets

fettløselighet. Fettløselige stoffer har høyere fordelingskoeffisient. Fordelingsforholdet forteller oss om forholdet mellom dissosiert og udissoisert form av stoffet i løsningen. Når verdien for fordelingsforholdet er høyt vil man få høyt utbytte. Fordelingsforholdet påvirkes av fordelingskoeffisienten, pH i vannfasen og stoffenes pKa-verdi [4].

LLE er en enkel og populær metode som er lett å utføre. Metoden har dessverre noen merkbare ulemper. Blant annet stort forbruk av løsemidler. Disse er som regel organiske løsemidler som krever spesielle håndteringsregler, er giftige og brennbare. En annen ulempe er utfordringen med automatisering. Dette er vanskelig med LLE og svært ønskelig i dagens industrisamfunn spesielt i bioanalyse. I tillegg er metoden tidskrevende [4].

Derfor var det ønskelig med forbedring og miniaturisering av denne metoden, eventuelt utvikling av en ny metode. Det var først i 1996 at Jeannot og Cantwell [1] publiserte det første arbeidet med en ny metode som baserte seg på LLE. Metoden heter SDME. I denne metoden brukte de en 1 ml vial som inneholdt vandig prøveløsning og et stavformet teflon sonde som er uthullet og sitter på plass ved hjelp av et lokk. Staven ble fylt med 8 μ l av et organisk løsningsmiddel (n-oktan). Under hele prosessen ble prøveløsningen omrørt ved hjelp av en magnetrører. Figur 1 viser en skjematisk tegning av metoden [1].

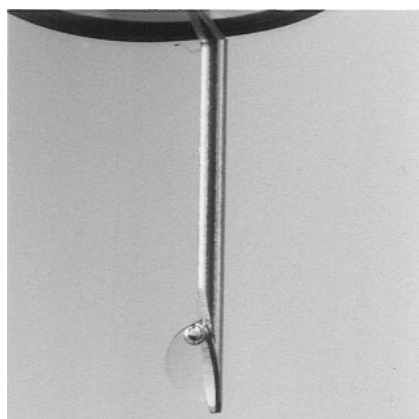


Figur 1: Illustrasjon av SDME systemet [1]

Analytten av interesse vil etter hvert ekstraheres over til det organiske løsningsmidlet og dette kan samles opp ved hjelp av en mikrosprøyte og injiseres inn i GC for analyse.

Metoden var lovende, hadde høy presisjon og analysetiden var kort. Men oppsamling av dråpen fra bunnen av teflonstaven var problematisk. Det krevde fylling av dråpen i starten av eksperimentet og samling av dråpen i slutten. Dermed prøvde Jeannot og Cantwell å redusere utfordringen ved å suspendere dråpen direkte inn i vandig prøveløsning. I dette tilfellet ville

dråpen henge fra nålen til en mikrosprøyte og var i direkte kontakt med prøveløsningen. Dråpen skulle være koblet til nålen under hele prosessen. Prøveløsningen skulle ristes ved en hastighet på 2000 rpm mens analyttene ble ekstrahert inn i dråpen ved hjelp av passiv diffusjon. Til slutt skulle dråpen trekkes tilbake inn i mikrosprøyten og brukes ved analyse i GC [3, 5]. Figur 2 viser hvordan en dråpe av et organisk løsningsmiddel i praksis henger fra nålen til en mikrosprøyte.



Figur 2: 1µl dråpe av n-oktan hengende på spissen av mikrosprøyte [5]

Apparatet som ble brukt under eksperimentet er det samme som ble brukt under teflonstav metoden. Forsøk med metoden viste at dråpen var mekanisk ustabil. Det var lett å miste dråpen inn i vandig prøveløsning gjennom ekstraksjonsprosessen [3].

For å forbedre metoden introduserte Pedersen-Bjergaard og Rasmussen i 1999 HF-LPME basert på hullfiber hvor organisk løsningsmiddel ble plassert i hulrommet til hullfiberen [3]. De klarte å finne en måte å beskytte akseptorløsningen mekanisk ved hjelp av hullfiberen slik at fiberen hindrer at løsningen forsvinner inn i prøveløsningen (donorfasen). Metoden var basert på kombinasjon av tidligere arbeid som ble gjort for utvikling av SDME og *Supported liquid membrane* (SLM) [3, 6].

Tidligere arbeid med SLM hadde vist at man kan ekstrahere basiske legemidler som finnes i biologiske prøver som plasma over til organiske løsningsmidler, som er immobilisert i porene til en polypropylenmembran eller hullfiber og ekstrahere dem videre til en vandig akseptorfase på andre siden av membranen [6]. Dette betyr en væske-væske-væske ekstraksjon.

Faktorer som har betydning for metoden er pH i donor, akseptorløsningen og volum i de to fasene.

1.3 Prinsipp

Hullfiber HF-LPME er en videreutvikling av SDME der dråpen er erstattet av en væske membran SLM. Membranen er et organisk løsemiddel som er immobilisert i porene til en hullfiber av polypropylen som ble plassert i den vandige løsningen med analyttene i (donorløsning). Inn i hulrommet til hullfiberen skal man ha en organisk løsning eller vandig løsning (akseptorløsning) [3]. Hullfiber HF-LPME metoden ble for første gang introdusert av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen i 1999 [3].

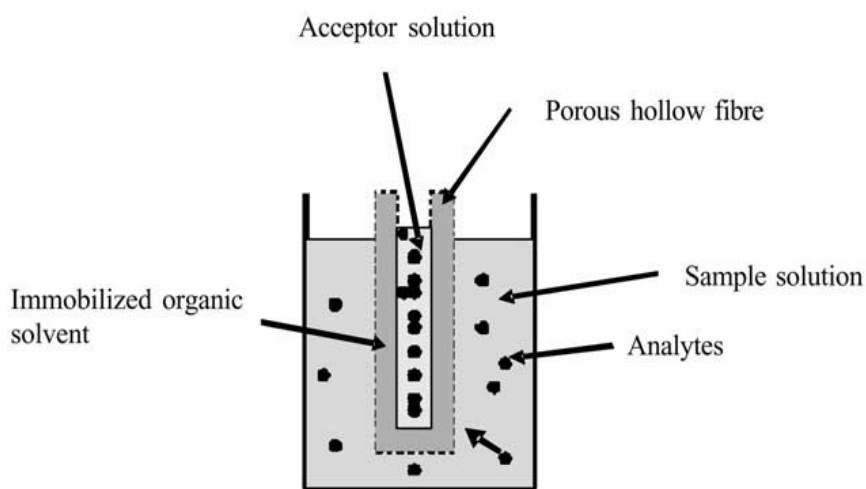
HF-LPME kan gjennomføres i to-fase eller tre-fase system.

I to-fase HF-LPME er akseptorløsningen en organisk løsning og analyttene ekstraheres fra en vandig løsning gjennom væskemembranen og inn i den organiske løsning. Fordelen med dette systemet er at akseptorløsningen er kompatibel med gass kromatografi alene eller i kombinasjon med massespektrometri (MS).

I tre-fase HF-LPME er analyttene ekstrahert fra vandig prøveløsning gjennom et organisk løsemiddel som er immobilisert inn i porene til hullfiber membranen og videre inn i vandig akseptorløsning som ligger i hulrommet til hullfiber. Fordelen med denne metoden er at den vandige akseptorløsningen er kompatibel med *high-performance liquid chromatography* (HPLC) og kapillærelektroforese (CE).

HF-LPME metoden gir høy oppkonsentrering og reduserer løsningsmiddelforbruket.

Samtidig kan man riste prøveløsningen godt uten at det skaper noe problem siden mikro-ekstraktet ikke er i kontakt med prøveløsningen. Metoden er mer robust.



Figur 3: Grunnleggende prinsipp for ekstraksjon i HF-LPME [2]

Figur 3 viser en enkel skisse av ekstraksjonsprosessen ved HF-LPME. Vandig prøveløsning fylles inn i en vial. Det brukes en liten porøs hullfiber av polypropylen for HF-LPME som skal være så tynn som mulig. Denne kan ha forskjellige formasjoner. En vanlig formasjon er U form. Man klargjør membranen i hullfiberen ved å dyppe den ned i organisk løsningsmiddel som har lav polaritet i noen få sekunder. I løpet av den korte tiden vil det organiske løsemiddelet bli immobilisert i porene til hullfiberen. Overskuddet blir fjernet ved å bruke tørkepapir. Ved bruk av stang formasjoner må da en liten mengde av organisk løsningsmiddel bli injisert inn i hulrommet til hullfiber membranen. Det organiske løsningsmiddelet vil hindre lekkasje over til vandig løsning ved å fungere som et tynt lag innenfor hullfiberen. Vanlig veggtykkelse til fiberen er 200 μm og totalt volum av organisk løsningsmiddel som finnes i immobilisert form er 15-20 μl [2]. For ioniserbare analytter vil pH i prøveløsning være justert slik at analytter er i uionisert form for å redusere løseligheten i vandig løsning og for å forbedre ekstraksjon inn i organisk fase. Etter immobiliseringen av SLM skal akseptorløsningen fylles inn i hulrommet til hullfiberen. Denne kan i noen tilfeller være et organisk løsningsmiddel av samme type som ble brukt for membranen, noe som gir oss en to-fase ekstraksjon eller den kan være en vandig løsning som resulterer i tre-fase ekstraksjon [3].

Hvordan SLM påvirker ekstraksjonen ble undersøkt ved å sammenligne resultater fra analyse av sure og basiske legemidler i tre-fase HF-LPME [7]. Resultater viste at utbytte er sterkt påvirket av type organisk løsemiddel som brukes. For basiske modellsubstanser ble høyeste utbytte oppnådd ved å bruke dodecylacetat, 2-oktanon og isopentyl benzen som SLM mens for sure modellsubstanser resulterte bruk av dodecylacetat, isopentyl benzen og 1-oktanol i høyest utbytte.

Det viste seg at resultatene generelt var bedre for ekstraksjon av sure substanser enn for basiske. Dette kan forklares ved at valgte sure stoffer hadde generelt høyere polaritet enn de basiske stoffene. Det er også kjent at ekstraksjonsutbytte er høyere for analytter med log P-verdier mellom 2-4 og reduseres når log P-verdien passerer 4 [7]. Basiske analytter som ble brukt i denne studien var ganske hydrofobe (log P i området 3.1-5.3) og ekstraksjon fra organisk SLM over til vandig akseptorløsning var noe begrenset grunnet høy log P.

Generelt konkluderes i artikkelen at tre-fase HF-LPME egner seg best for analytter med log P > 2. For stoffer med log P < 2 anbefales å bruke en *carrier*-mediert HF-LPME.

På denne måten vil analyttene ekstraheres fra vandig prøveløsning gjennom organisk fase i porene av hullfiberen og videre inn i akseptorløsningen i hulrommet til hullfiberen. For å

redusere tiden kan man riste eller røre prøveløsningen slik at kontakten mellom analyttene og membranen økes.

1.4 Fordeler og ulemper ved HF-LPME

HF-LPME kan gjennomføres i to forskjellige systemer dvs. to-fase og tre-fase HF-LPME.

Dette er en fordel siden akseptorløsningen kan brukes direkte i GC eller GC/MS instrumentet hvis det utføres to-fase HF-LPME. Grunnen til det er at akseptorløsningen er et organisk løsemiddel. I tre-fase HF-LPME er akseptorløsningen vandig løsning og derfor er det kompatibel med HPLC og CE instrumentet for direkte analyse.

En annen fordel ved HF-LPME er at forbruket av organiske løsningsmidler er betydelig redusert siden volumet av SLM er typisk 5-30 μl ved gjennomføring av metoden og dermed er metoden miljøvennlig.

Siden volumet av prøveløsningen er vesentlig større enn volumet av akseptorløsningen som i mange tilfeller er noe mellom 2-30 μl , vil bruk av så lite mengde akseptorløsning gi høy oppkonsentrering. Dette gjør at prosesser som fordamping og rekonstituering er unødvendige [8].

En annen fordel ved HF-LPME er at kostanden til hver ekstraksjon er betydelig redusert sammenlignet med fast-fase mikroekstraksjon (SPME). Derfor er det mulig at hver ekstraksjonsenhet brukes en gang og dette gir oss muligheten til å eliminere *carry-over* mellom hver ekstraksjon som ofte oppleves ved bruk av SPME [9].

HF-LPME er en effektiv metode med hensyn på prøverensning. Dette kan nås ved hjelp av pH endringer i de forskjellige faser og samtidig bruk av væske-membranen SLM. Tre-fase HF-LPME er blitt spesielt rapportert til å være en effektiv metode for analyse av kompliserte biologiske- og miljøprøver. For basiske stoffer skal pH av donorløsningen være høy nok til å hindre ionisering og pH av akseptorløsningen skal være lav nok til å ionisere basiske stoffer og hindre tilbakeekstraksjon. Det anbefales å justere pH 1-3 enheter ovenfor pKa-verdien i prøven og 1-3 enheter under pKa-verdien i akseptorløsningen [7]. For sure stoffer er pH forholdet omvendt enn for basiske stoffer. Dette innebærer lav pH i prøveløsningen og høy pH i akseptorløsningen

Det må også nevnes at HF-LPME kan bli automatisert ved hjelp av utstyr som er tilgjengelig slik at man får en tilnærmet helautomatisk prøveopparbeidelsesmetode [8]. Eksempel på dette er PALME hvor man bruker HF-LPME teknikken i 96-brønns format [10].

Hovedproblemet er at metoden er tidskrevende. Normal ekstraksjonstid for å oppnå likevekt er mellom 15-45 minutter for prøveløsningsvolum under 2 ml. Men denne øker betraktelig når prøveløsningsvolumet øker opp til 1 L og da trenger man opptil 2 timer for å oppnå likevekt [8].

Når ekstraksjonstiden er over anbefales å fjerne hullfiberen fra løsningen for å avslutte ekstraksjonen. Samtidig anbefales å samle opp akseptorløsningen med en gang for å ikke miste analytt på grunn av delvis tilbakeekstraksjon til SLM [7]. Siden mengde akseptorløsning er veldig liten er det viktig å sørge for å unngå fordamping. Derfor anbefales å oppbevare den ved lav temperatur og lukket beholder. Det er viktig å måle mengde akseptorløsning etter å fjerne den fra hullfiberen. Har man forskjellig mengde er det tegn til lekkasje. I slike tilfeller skal akseptorløsningen forkastes.

2 Hensikt

Hensikten med denne masteroppgaven innen væskefasemikroekstraksjon (Liquid-phase microextraction (LPME)) er å beskrive grunnprinsipper for HF-LPME-analyse, utdype utvalgte vitenskapelige studier utført med HF-LPME som analysemetode, beskrive hvilke ulike retninger HF-LPME har tatt og i hvilken grad HF-LPME som analysemetode får innpass i fremtidens laboratorier.

3 Metode

3.1 Litteraturstudie som metode

Litteraturstudie ble valgt som metode for arbeidet med denne masteroppgaven. Denne metoden ble valgt isteden for laboratoriearbeid. Laboratoriearbeid kan gi bedre kjennskap til HF-LPME metoden i sin helhet og kan gi en bedre forståelse av hvordan metoden utføres i praksis. På den annen side vil en litteraturstudie gi oversikt over utbredelse av metoden, dens popularitet, anvendelse og utviklingsmuligheter. For gjennomføring av denne oppgaven ble det bestemt å finne publiserte artikler ved hjelp av de anerkjente databasene Scifinder, PubMed og Web Of Science. Søk etter HF-LPME metoden i databaser viste at det finnes mange publiserte artikler hvor HF-LPME er blitt brukt som ekstraksjonsmetode. Samtidig er det tilgjengelig tilstrekkelige data som beskriver teorien til HF-LPME metoden. Dermed er konklusjonen at en litteraturstudie vil være egnet metode til å tilegne teoretisk kunnskap om HF-LPME. Som andre metoder har litteraturstudier også noen ulemper. Forskningen endrer seg, utvikles og fornyes stadig. Nye forbedringer, retningslinjer eller utfordringer blir diskutert og publisert. De artiklene som ble brukt i en masteroppgave for eksempel kan fort bli gamle og trenger oppdatering. En annen utfordring er valg av artikler som ansees som viktige. Utvalget er så pass stort at det kan være utfordrende å finne de artiklene som er de mest relevante artiklene til oppgaven. Risikoen for at viktige, relevante studier blir utelatt er større jo større antall artikler som er tilgjengelig. Samtidig kan resultatene av søket etter relevante vitenskapelige studier være avhengig av hvilke søkemetode man bruker. For eksempel vil bruk av tidsskrifter alene begrense resultatene av søket. Men dette kan unngås hvis flere søkemetoder blir brukt. Det er helt klart at resultatene av studien er avhengig av tilgjengelige data. Kriterier for å vurdere at resultatet i et arbeid er i samsvar med kravene som stilles til bioanalytiske metoder, vil være avhengig av hvilke guideline som brukes (FDA eller EMA for eksempel). Det er også viktig å legge merke til at artikler som blir publisert inneholder data som forfatteren har valgt å publisere. Litteraturstudie som metode har størst verdi når informasjon er oppdatert.

3.2 Kriterier for valg av artikler

Søk etter studier hvor HF-LPME har blitt brukt som analysemetode ga 385 resultater i PubMed, 565 resultater i Web Of Science og 1043 resultater i SciFinder. Søk etter Liquid-phase microextraction ga ca. 2500 artikler i Pubmed. For å avgrense oppgaven ble følgende kriterier satt for å inkludere en artikkel:

- Artikkelen skulle være relatert til legemiddelanalyse
- HF-LPME skulle være brukt som prøveopparbeidelsesmetode
- Stoffene som ble analysert skulle være legemidler eller metabolitter
- Artikkelen skulle vært publisert i internasjonalt fagfelleverdert tidsskrift
- Artikkelen skulle representere en retning som kan være interessant for fremtidens laboratorium i legemiddelanalyse

Flere søkemotorer er tilgjengelig for studenter for å finne artikler og vitenskapelige studier. I løpet av arbeidet med denne oppgaven ble Web of Science, Scifinder og Pubmed brukt. For å finne artiklene ble flere søkeord bruk. Søkeord som HF-LPME, HF-LPME, Liquid-Phase Microextraction, Hollow-fiber Liquid-Phase Microextraction, single-drop microextraction, sample preparation, two-phase og three-phase ble benyttet.

I tillegg til søkeordene over ble artikler hvor S. Pedersen-Bjergaard og K.E. Rasmussen står som forfattere også søkt etter. Grunnen til dette var å finne artiklene de har publisert helt fra starten av utviklingen av denne metoden, og videre noe som reflekterer deres arbeid og tanker med denne metoden. På den måten ville en tilegne seg kunnskap som trengs for å forstå denne metoden og dens fremgangsmåte bedre. På en annen måte ville slike artikler hjelpe med å forstå bedre helheten av det som er gjort i andres arbeid.

4 Resultater

4.1 Forskning, utbredelse og relevante studier

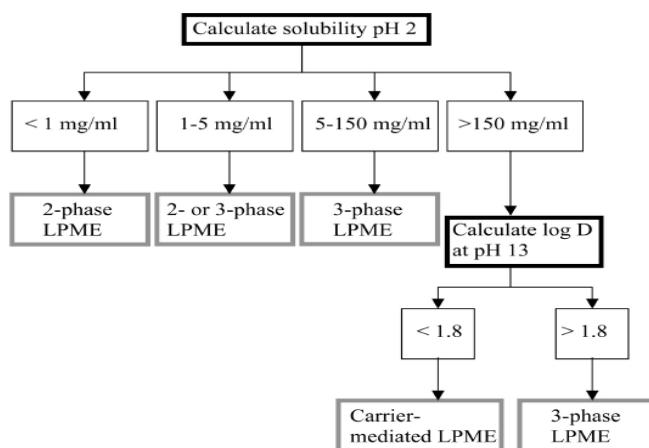
4.1.1 HF-LPME og basiske legemidler

Basiske legemidler kan ekstraheres ved hjelp av to-fase og tre-fase HF-LPME. I en studie ble 58 forskjellige basiske legemidler ekstrahert ved hjelp av HF-LPME [11].

Basiske legemidler ble ekstrahert fra 1,5 ml prøveløsning med pH 13, gjennom 15 µl organisk løsningsmiddel som var immobilisert i porene til hullfiberen og videre inn i 10 mM HCl løsning som akseptorfase som var tilgjengelig i hulrommet til hullfiberen. For stoffer med oppløselighet under 1 mg/ml ved pH 2 ble to-fase HF-LPME brukt som ekstraksjonsmetode siden gjenvinningen ved tre-fase HF-LPME var lav. I begge system ble dodecylacetat brukt som organisk løsningsmiddel. Under forsøket ble det observert at de fleste komponenter med oppløselighet fra 1-5 mg/ml ble effektiv ekstrahert med utbytte over 30 % mens alle komponenter med oppløselighet fra 5-150 mg/ml ble ekstrahert med gjenvinning over 30 % ved tre-fase HF-LPME.

Studien påviste at hydrofilisiteten til de fleste legemidler med oppløselighet over 150 mg/ml og $\log D < 1,8$ hindret dem fra å gå over til organiske fasen, mens komponenter med $\log D > 1,8$ ble effektiv ekstrahert. Forsøk med *carrier*-mediert HF-LPME hvor et ion-par reagens (oktansyre) blir tilsatt prøveløsningen viste seg å være løsningen for å forbedre gjenvinningen. I slike tilfeller ble volum av prøveløsningen redusert til 100 µl. For tre-fase HF-LPME ble en 1,5 ml vial med skrulokk brukt.

Figur 4 viser skjematisk valg av metoden i forhold til oppløseligheten.



Figur 4: Fremgangen til valg av HF-LPME metode [11]

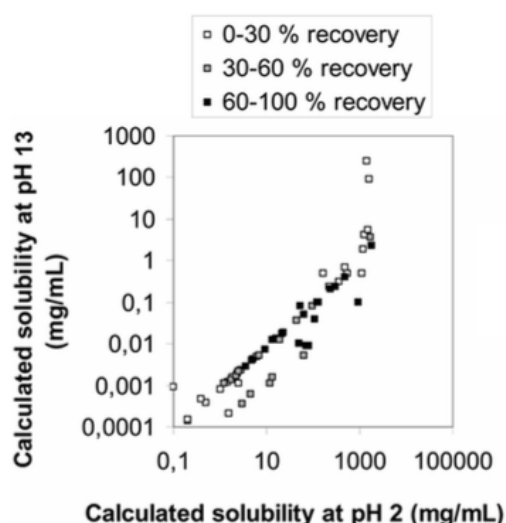
En pipette ble trukket gjennom silikonveggen til skrulokket og tippet ble koblet til polypropylen hullfiberen som var 18 mm lang. Fiberen hadde en indre diameter på 1200 μm og var 200 μm tykk med en porestørrelse på 0,2 μm . Under hele eksperimentet ble vialen rystet ved 1500 rpm ved å bruke en vibrator.

Prøveløsningen med et volum på 500 μl ble fylt i en vial og prøveløsningen ble gjort alkalisk med 100 μl 2M NaOH og fortynnet med 900 μl rent vann til et totalvolum på 1,5 ml.

Hullfiberen ble dyppet ned inn i dodecylacetat i 5 sekunder og deretter overført til vannbad med ultralyd i 15 sekunder for å fjerne overflødig organisk løsningsmiddel. Videre ble 15 μl 10 mM HCl injisert inn i hulrommet til hullfiberen ved hjelp av en mikrosprøyte. Deretter ble fiberen plassert inn i vialen som inneholdt prøveløsningen og vialen ble rystet i 60 minutter ved 1500 rpm ved å bruke en vibrator. Etter ekstraksjon ble akseptorfasen fjernet ved hjelp av mikrosprøyte og overført til en 200 μl mikro *insert* for videre analyse med et kapillær elektroforese (CE) instrument.

For *carrier*-mediert HF-LPME ble prosessen gjennomført i en 100 μl *insert* plassert inn i den samme type vial som ble brukt for tre-fase HF-LPME med samme type skrulokk.

To 0,8 mm medisinske sprøytespisser ble presset gjennom silikonveggen til skrulokket og endene ble koblet sammen ved en 6,5 cm lang polypropylen hullfiber med en indre diameter på 600 μm , veggtykkelse på 200 μm og porestørrelse på 0,2 μm . Gjennom hele ekstraksjonsprosessen ble vialen rystet ved 1500 rpm ved å bruke en vibrator. Figur 5 viser hvordan ekstraherbarheten påvirkes ved endring i pH.



Figur 5: Ekstraherbarheten av legemidler (lav, medium eller høy utbytte) som funksjon av kalkulert løselighet ved pH 2 og pH 13 [11]

Mikro *insert*-en ble fylt med 50 μ l prøveløsning og 50 μ l 25 mM fosfatbuffer som inneholdt 50 mM natrium acetat. Hullfiberen ble dyppet i n-oktanol i 5 sekunder og videre overført til vannbad med ultralyd i 15 sekunder for å fjerne overflødig organisk løsningsmiddel. Deretter ble 20 μ l av 50 mM HCl løsning (akseptorfase) injisert inn i hulrommet til hullfiberen. Fiberen ble plassert i mikro *insert*-en som inneholder 100 μ l prøveløsning og ble rystet i 60 minutter ved 1500 rpm ved hjelp av en vibrator. Etter at ekstraksjonen var ferdig ble akseptorfase plukket opp ved hjelp av en mikrosprøyte og overført inn i en 200 μ l *insert* for videre analyse med CE instrumentet. Tabell 1 viser oppnådd utbytte fra 9 forskjellige legemidler ved å bruke *carrier*-mediert HF-LPME.

Tabell 1: Utbytte ved *carrier*-mediert HF-LPME fra vandig prøver og plasmaprøver [11]

Drug	Recovery [%]	
	Water	Plasma
Cimetidine	51	54
Ranitidine	17	16
Practolol	41	44
Hydralazine	52	35
Atenolol	11	10
Sotalol	25	23
Timolol	67	62
Codeine	69	58
Phenylpropanolamine	68	65

(n = 3, RSD < 10 %)

Metoden viser at hullfiber HF-LPME kan brukes som ekstraksjonsmetode for mange basiske legemidler. Oppløseligheten og log D verdier spiller en viktig rolle for valg av teknikk som egner seg best for ekstraksjonsmetoden.

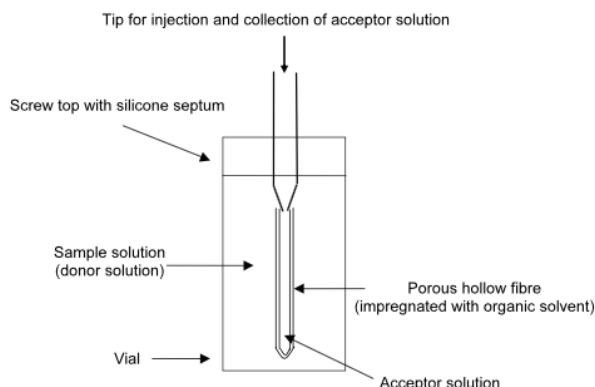
Ekstraksjonstiden i tre-fase HF-LPME og *carrier*-mediert HF-LPME er 60 minutter. Dette er relativt lang tid i forhold til tradisjonelle ekstraksjonsmetoder (klassiske metoder) som SPE og LLE [12]. HF-LPME prosedyrene er ganske enkle og krever lite laboratoriarbeid.

Ekstraksjonsutbyttet varierer fra stoff til stoff. Ofte ligger utbyttet i området 30-70 %, noe som er akseptabelt så lenge de er reproducerbare innen én dag og fra dag til dag. For enkelte legemidler er utbytte over 70 %, og dette er sammenlignbart med SPE og LLE [12]. For polare legemidler med lavt utbytte ved tre-fase HF-LPME ble *carrier*-mediert HF-LPME brukt og utbyttene økte betraktelig. I denne studien ble sammenhengen mellom oppløselighet

og utbytte studert nøye, men oppkonsentrering er ikke nevnt for de ulike legemidlene. Generelt er oppkonsentreringen veldig høy i HF-LPME siden prøveløsning er i ml volum og akseptorløsningen er i μl volum. Forbruk av organisk løsningsmiddel er veldig lavt og det samme er kostanden per analyse. Studien er omfattende og 58 basiske legemidler ble analysert. I artikkelen blir ikke valideringsresultater nevnt. Dette er en av de største studiene som ble utført for å sjekke anvendbarheten av HF-LPME. Arbeidet ble vurdert som relevant for denne oppgaven.

4.1.2 HF-LPME og stereoselektiv analyse

Hullfiber HF-LPME metoden ble brukt for ekstraksjon av enantiomere legemidler [13]. I dette forsøk ble citalopram (CIT) og dens aktive metabolitt desmetylcitalopram (DCIT) valgt som modellsubstans for studien. Tre-fase HF-LPME ble brukt for å ekstrahere legemidlene, 1 % sulfat- β -cyclodekstrin som kiralt velger i kombinasjon med 12 % acetonitril (ACN) inn i 25 mM fosfatbuffer pH 2,5 som var separasjonsbuffer for CE instrumentet. Dodecylacetat ble brukt som organisk løsningsmiddel som skal immobiliseres inn i porene til hullfiberen og akseptorfasen var 20 mM fosfat med pH 2,75. Figur 6 viser hvordan HF-LPME utstyret er satt sammen under forsøket. Akseptorløsningen ble brukt for videre analyse med et CE instrument etter at ekstraksjonen var over.



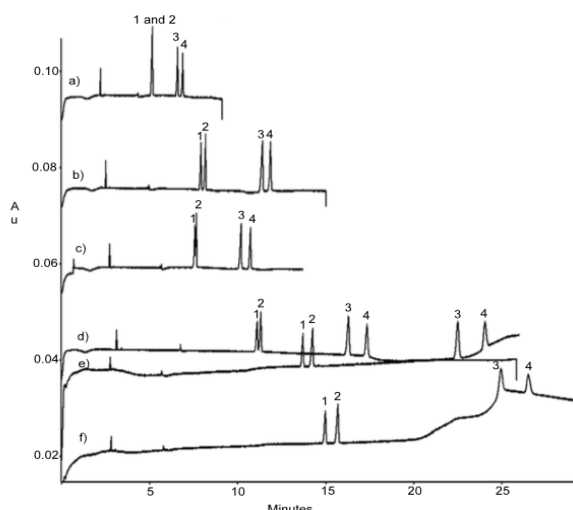
Figur 6: Prinsippskisse av HF-LPME [13]

Metoden er slik gjennomført:

Det ble brukt en 1,5 ml vial med skrulokk og silikon topp. Et spesiallaget polypropylen presisjon formet tipp ble presset gjennom silikon toppen og denne ble brukt for å injisere akseptorløsningen inn i hulrommet til hullfiberen, plukke opp akseptorløsningen og for å gi støtte til fiberen.

En 18 mm lang hullfiber med en indre diameter på 1,2 mm, porestørrelse på 0,2 μm og veggtykkelse på 200 μm ble plassert ved enden av tippet.

Før ekstraksjonen begynner tilsatte de 100 μl 2 M NaOH til 1 ml plasma for å gjøre det alkalisk. Løsningen ble fortynnet med 150 μl vann og 250 μl av 600 ng/ml intern standard. Hullfiberen ble klargjort for ekstraksjonen ved å dyppe den ned i organisk løsning i 5 sekunder og overflødig organisk løsningsmiddel ble fjernet ved å ha den 15 sekunder i vannbad med ultralyd. Etter at organisk løsningsmiddel ble plassert inn i porene til hullfiberen ble akseptorløsningen injisert inn i hulrommet til hullfiberen ved hjelp av mikrosprøyte. Nålen til mikrosprøyten ble ledet gjennom tippet til bunnen av fiberen før injiseringen av akseptorløsningen. Etter å injisere akseptorløsningen ble ekstraksjonen gjennomført i 45 minutter og prøveløsningen ble rystet ved 1500 rpm gjennom hele ekstraksjonsprosessen. Figur 7 er elektroferogram som viser separasjon av citalopram og desmemetylcitalopram i 25 mM fosfatbuffer pH 2,5 + 1 % sulfat- β -cyklodekstrin i forskjellige mengder acetonitril.



Figur 7: Elektroferogram fra separasjon av CIT og DCIT ved hjelp av forskjellige separasjonsbuffere. Alle analyser ble utført med omvendt polaritet. Injeksjon: 5 s ved 0,5 psi. Kapillær: 40 cm (effektiv lengde), 75 μm i.d. 1=R-DCIT, 2=R-CIT, 3=S-CIT og 4=S-DCIT. (a) 25 mM fosfat pH 2.5+1 % S- β -CD; (b) 25 mM fosfat pH 2.5+1% S- β -CD+10% ACN; (c) 25 mM fosfat pH 2.5+1% S- β -CD+10% metanol; (d) 25 mM fosfat pH 2.5+1% S- β -CD+10% isopropanol; (e) 25 mM fosfat pH 2.5+1% S- β -CD+10% dioksan; (f) 25 mM fosfat pH 2.5+1% S- β -CD+10% THF [13]

For å validere metoden ble det tilsatt 0,25 ml 600 ng/ml internstandard av CIT og DCIT til alle prøver. Intra-dag nøyaktighet var < 12,8 % RSD og inter-dag nøyaktighet var < 14,5 % RSD for alle enantiomere i tre forskjellige konsentrasjoner (25, 80 og 160 ng/ml).

Kalibreringskurven var lineær og $r > 0,9997$ for CIT og $r > 0,997$ for DCIT for alle

konsentrasjoner (25, 80, 120, 160, 240 og 320 ng/ml rasemisk CIT og DCIT). LOQ ($S/N=10$) var 5.2, 4.4, 11.2 og 8.9 ng/ml og LOD ($S/N=3$) var 1.6, 1.4, 3.4 og 2.7 ng/ml for S-CIT, R-CIT, S-CIT og R-DCIT henholdsvis. Utbytte var 46 % for CIT og 29 % for DCIT og oppkonsentrering var 31 og 19 ganger for CIT og DCIT henholdsvis.

Denne metoden ble gjennomført for første gang for ekstraksjon av enantiomere legemidler basert på hullfiber LPME og CE. Forsøket er en bekreftelse på at man kan gjøre stereoselektiv analyse ved hjelp av HF-LPME.

Ekstraksjonstiden var 45 minutter noe som er relativt lang tid sammenlignet med tradisjonelle ekstraksjonsmetoder [12]. Ekstraktene var rene og dette kan sees fra elektrogrammet i figur 7. Gjennom studien klarte de å oppkonsentrere analyttene 19 og 31 ganger, noe som regnes som en relativ høy oppkonsentrering. Utbytte for CIT var 46 %, noe som er akseptabelt, mens utbytte til DCIT var litt lavere. Prosedyren til metoden er enkel og kostnaden per analyse er lav. Metoden bruker veldig lite organiske løsemidler. Valideringsresultater er akseptable og innenfor kravene til FDA guidelines [14]. Lineariteten i det undersøkte konsentrasjonsområde var tilfredsstillende med r^2 over 0,99 og RSD verdiene var under 15 %. LOQ for CIT var under 11,2 ng/ml, som er innenfor oppgitt terapeutisk blodkonsentrasjon for dette legemiddel (0,01-0,2 $\mu\text{g/ml}$) [15]. Legemidlene som ble ekstrahert og analysert i denne oppgaven brukes i behandling av depresjon og behandlingen ofte krever nøyaktige vurderinger av styrken på legemiddelet. Dette krever nøyaktig laboratoriearbeid og sensitiv analyseinstrument. Dermed ble studien ansett som aktuell for denne oppgaven.

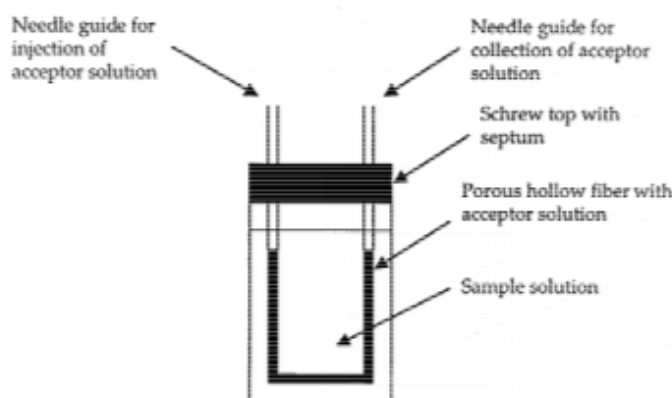
4.1.3 HF-LPME og gasskromatografi

Fordelen med to-fase HF-LPME er at organiske løsningsmidler som brukes i membran og akseptorløsningen kan injiseres direkte i gasskromatografi instrumentet for videre separasjon og deteksjon. Dermed er det mulig at man kombinerer HF-LPME med GC. I et forsøk ble HF-LPME i kombinasjon med gasskromatografi brukt for ekstraksjon og analyse av benzodiazepiner fra biologiske prøver [16].

Diazepam og metabolitten N-desmetyldiazepam ble valgt som målsubstans. For urinprøver ble butyl acetat: 1-oktanol (1:1 v/v) valgt som akseptorfase og for plasmaprøver ble butyl acetat: 1-oktanol (1:3 v/v) valgt som akseptorfase. En mengde urinprøve tilsvarende 3500 μl ble overført til en 4 ml vial og prazepam (intern standard)(5 nmol/ml) og 300 μl 0,1 M

fosfatbuffer (pH 7.5) ble tilsatt og blandingen ble agitert i 30 sekunder. For plasmaprøver ble en mengde på 3000 μ l plasma tilsatt prazepam (5 nmol/ml) og blandet i en 4 ml vial. Deretter ble 200 μ l metanol tilsatt for å redusere proteinbindingsgraden av benzodiazepiner. Prøven ble agitert i 30 sekunder.

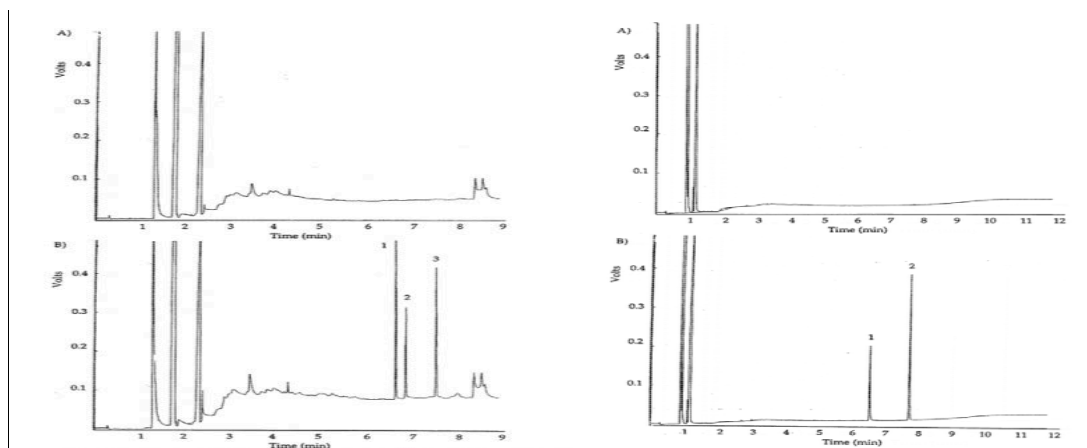
HF-LPME apparatet besto av to 0,8 mm O.D medisinske sprøytenåler som ble presset gjennom silikon toppen av skrulokket til vialen. Begge nålene var tilkoblet en 6 cm lang polypropylen hullfiber som hadde en indre diameter på 600 μ m, veggtykkelse på 200 μ m og porestørrelse på 0,2 μ m. Figur 8 viser hvordan HF-LPME apparatet ble satt sammen under forsøket.



Figur 8: HF-LPME enheten brukt i analysen [16]

Hullfiberen ble dyppet i det organiske løsningsmiddelet i ca. 10 sekunder for å immobilisere løsningsmiddelet inn i porene til hullfiberen. Deretter ble akseptorløsningen overført til hulrommet til hullfiberen ved hjelp av en 50 μ l sprøyte.

Hullfiberen ble plassert i prøveløsningen og enheten ble rystet ved 600 rpm i 50 minutter før akseptorløsningen ble overført til en 200 μ l *insert* som var plassert i en 2 ml *autosampler* vial i et GC apparat for analyse. Figur 9 viser resultatet av analysen av både urinprøver og plasmaprøver.



Figur 9: Figuren til venstre viser kromatogram av A) plasma prøve uten tilsatt legemiddel og B) plasmaprøve tilsatt 5 nmol/ ml diazepam (1) N-metyl diazepam (2) og prazepam (3) som i.s. Figuren til høyre viser kromatogram av (A) urinprøve uten tilsatt legemiddel og (B) urinprøve tilsatt 5 nmol/ml N-desmetyl diazepam (1) og prazepam (2) som i.s [16].

Kalibreringskurven i konsentrasjonsområdet 0,5-8,0 nmol/ml var lineær for diazepam og N-desmetyldiazepam med korrelasjon koeffisienten $r = 0,996$ eller bedre. LOD ($S/N=3$) var henholdsvis 0,020 nmol/ml og 0,115 nmol/ml for N-desmetyldiazepam i urin og plasma og 0,025 nmol/ml i plasma for diazepam. LOQ ($S/N=10$) var henholdsvis 0,070 og 380 nmol/ml for N-desmetyldiazepam i urin og plasma og 0,080 nmol/ml for diazepam i plasma. RSD og bias for intra og inter-assay var henholdsvis 6,6 % og 15,6 % i urin og 12,3 % og 11,7 % for plasma. Ekstraksjonsutbytte var 69 % for N-desmetyldiazepam i urin og 50 % i plasma. Oppkonsentreringsfaktoren var 104 i urin og 64 i plasma. For diazepam var ekstraksjonsutbytte 68 % i plasma og oppkonsentreringsfaktoren var 88.

Resultater i studien viser at HF-LPME er en ekstraksjonsmetode med høy potensiale for bruk i legemiddelanalyse i kombinasjon med GC.

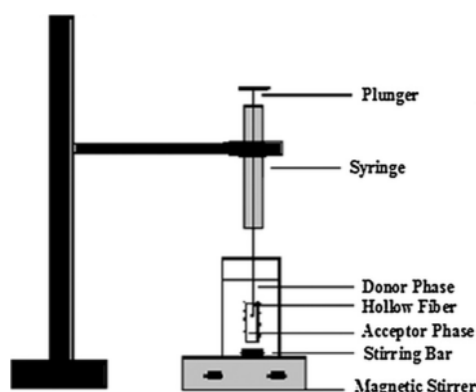
Ekstraksjonstiden var 50 minutter, noe som er relativt lang tid i forhold til tradisjonelle ekstraksjonsmetoder som SPE og LLE [12]. Ekstraktene var rene for urinprøver ut fra de publiserte kromatogrammene, men for plasmaprøver var de ikke helt rene og man kan se en del bakgrunnstopper i kromatogrammene. Prosedyren er enkel. To-fase HF-LPME prosedyren er miniaturisert væske-væske ekstraksjon og krever lite laboratoriearbeid.

Ekstraksjonsutbyttene var høye, og opp mot 69 % som er akseptable verdier. Det samme var oppkonsentreringsfaktorene, og spesielt for N-desmetyldiazepam hvor oppkonsentreringsfaktoren var 104 ganger fra urinprøver. Det brukes lite organisk

løsningsmiddel og kostnaden per analyse er lav. Valideringsresultatene var akseptable og innenfor kravene til FDA guidelines [14]. Diazepam har molarmasse: 284,74 g/mol. Dette betyr at LOQ i studien er $(0,07 \text{ nmol/ml} * 284,74 \text{ g/mol}) = 19,92 \text{ ng/ml}$. Terapeutiske konsentrasjon for diazepam er 0,2-2 µg/ml, og dermed kan denne metoden måle konsentrasjoner av diazepam som er lavere enn det terapeutiske vindu [15]. Benzodiazepiner er en gruppe legemidler som er godt studert. Arbeidet ble ansett som relevant siden det viser kompatibiliteten av HF-LPME med GC.

4.1.4 HF-LPME og planteekstrakter

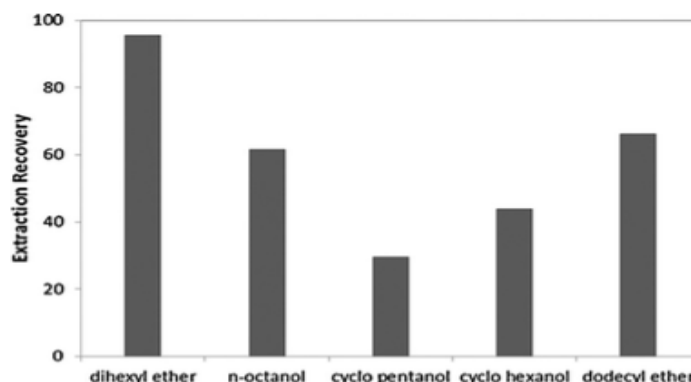
I et forsøk ble muligheten av å bruke HF-LPME for ekstraksjon av planteekstrakter i kombinasjon av HPLC/UV undersøkt [17]. Artikkelen ble valgt siden planten inneholder substanser som selges som naturmedisin i Norge og har medisinsk effekt. Som substansmodell ble *valerinic* syre (VA) som finnes i planten *Valeriana officinalis* valgt. Figur 10 viser hvordan HF-LPME apparatet ble satt sammen. Slik ble analysen utført:



Figur 10: Illustrerer HF-LPME-plattformen som ble brukt [17]

5 ml vandig prøveløsning ble overført til en 10 ml vial. Et magnetrør ble plassert inn i vialen. 10 µl akseptorløsning ble injisert inn i hullfiberen. Fiberen ble dyttet ned i organisk løsningsmiddel (diheksyleter) i 10 sekunder og videre inn i ionebyttet vann i 5 sekunder for å vaske av ekstra organisk løsningsmiddel fra overflaten til fiberen. En sprøyte ble koblet til fiberen som er bøyd til en U-form. Løsningen ble under ekstraksjonen omrørt ved hjelp av magnetrør i vialen ved en hastighet på 1000 rpm for 30 minutter og etter at ekstraksjonen var over ble fiberen fjernet fra prøveløsningen og akseptorløsningen (vandig løsning pH 9,5) ble plukket opp ved hjelp av sprøyten. Til slutt ble 10 µl av akseptorløsningen injisert inn i

HPLC instrumentet for analyse. Figur 11 viser effekten av organiske løsningsmidler på ekstraksjon av syren. Metoden viste seg å være effektiv for ekstraksjon og opprensning av planteekstrakter i biologiske prøver.



Figur 11: Viser effekt av organisk løsningsmiddel på ekstraksjonsutbytte av 40 µg/l av VA. Prøveløsning (DP): 5 ml, omrøringshastighet: 1000 rpm, ekstraksjonstid: 30 min, donorfase pH 2.5, akseptorfase pH 9.5, volum av Akseptorfase = 10.0 µL [17]

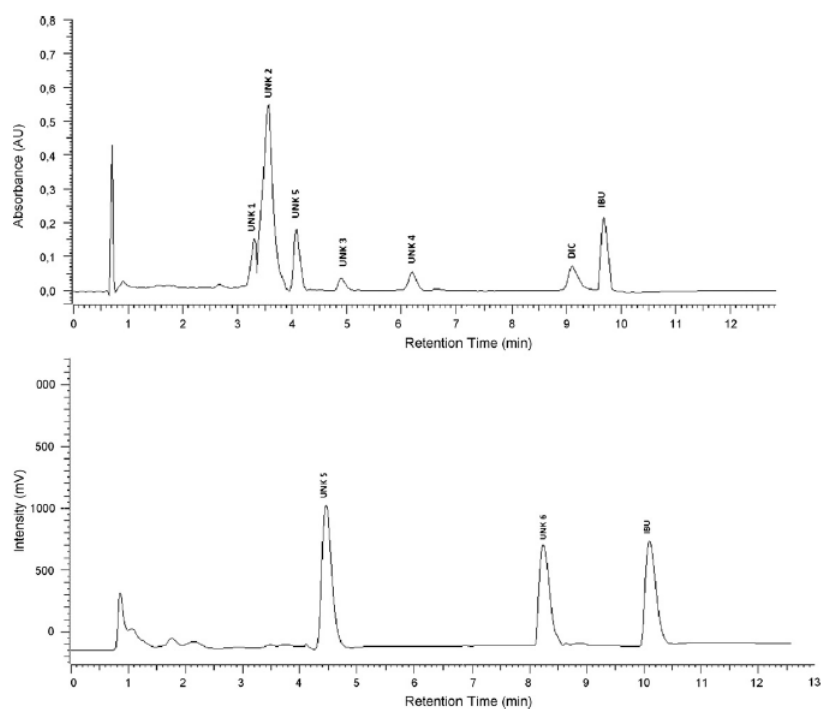
Kalibreringskurver var lineær i konsentrasjonsområder 7,5-850 µg/L med korrelasjonskoeffisient $r^2 = 0,999$, LOD= 2,5 µg/L og RSD verdier var mindre enn 4,36 %. Resultater viste oppkonsentrering opptil 446 ganger og effektiv prøverensning etter at ekstraksjonen var over.

Tre-fase HF-LPME ble brukt for ekstraksjon av planteekstrakter. Ekstraksjonstiden var 30 minutter, noe som er akseptabel sammenlignet med andre HF-LPME studier, men noe høyt sammenlignet med tradisjonelle ekstraksjonsmetoder [12]. Prosedyren er enkel og bruker standard prosedyre for HF-LPME. Ekstraktene var ikke rene, dette kan sees av kromatogrammene. Årsaken kan være innholdet av flere komponenter i prøveløsningen. Ekstraksjonsutbytte er ikke gitt med tall men av tabellen i artikkelen kan man se at det høyeste utbytte i område 90 % ble oppnådd da 5 ml donorfase ble brukt i analysen. Men oppkonsentreringen var høy, 446 ganger, siden analyttene ble ekstrahert fra 5 ml donorløsning og over til 10 µl akseptorløsning. Det ble brukt lite organisk løsemiddel i analysen og kostnaden per analyse var lav. Valideringsresultater var innenfor kravene til FDA guidelines [14]. RSD verdiene var ganske lave, og linearitetsverdien er over 0,99. Ekstraksjon og analyse av planteekstrakter er ikke relevant for denne oppgaven. Studien ble valgt fordi den representerer forskjellige bruksområder av metoden.

4.1.5 HF-LPME og sure legemidler

Tre-fase HF-LPME ble brukt for analyse av sure legemidler. Sure legemidler som ibuprofen (IBU), diklofenak (DIC) og acetylsalisylsyre (SAC) ble ekstrahert ved hjelp av hullfiber HF-LPME metoden fra biologiske prøver og analysert ved HPLC. For deteksjon ble det brukt en serie koblet *diode array* detektor (DAD) og fluorescence detektor (FLD) [18].

En 27 cm lang hullfiber ble vasket med aceton i ultralyd bad og etter at hullfiberen ble tørr ble den dyppet ned i organisk membranløsning (diheksyleter) i 5 sekunder og deretter ble den flyttet til ultralyd bad i 30 sekunder for å fjerne overskuddet. Hulrommet til fiberen ble fylt med 50 µl av akseptorløsning (natriumhydroksid) ved å bruke en HPLC sprøyte. Under ekstraksjon var hullfiberen dekket av 50 ml prøveløsning og det hele ble omrørt i 15 minutter ved 300 rpm. Etter at ekstraksjonen var over, ble hullfiberen tatt ut og akseptorløsningen ble samlet opp og injisert i HPLC instrument ved hjelp av en HPLC sprøyte. Figur 12 viser kromatogram fra analyse av IBU, DIC og SAC hvor man kan se andre ukjente topper tilstede.



Figur 12: Kromatogram av HF-LPME-FID analyse etter oral administrering av ibuprofen og diklofenak [18]

For analyse av sure legemidler er det viktig å ha lav pH verdi (pH 2) i donorfase og høy pH verdi (pH 12,5) i akseptorfase. Resultater viste at HF-LPME metoden egner seg for analyse av sure legemidler i kombinasjon av HPLC.

Tabell 2 viser oppnådd utbytte fra analyse av urinprøver.

Tabell 2: Utbytteresultater i (%) for IBU, SAC og DIC fra analyse av urinprøver ved HF-LPME/HPLC [18]

Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DAD			FLD	
	SAC ^a	DIC ^a	IBU ^a	SAC ^a	IBU ^a
0.025	–	–	–	–	82.3 ± 1.2
0.2	94.0 ± 1.1	99.0 ± 0.7	85.3 ± 1.0	95.3 ± 0.9	–
1.0	95.8 ± 0.9	98.2 ± 0.5	84.8 ± 0.6	–	–
2.0	95.5 ± 0.8	97.1 ± 0.8	83.2 ± 0.5	–	–

(–) Out of linear range.

^a Average of three determinations ± standard deviation.

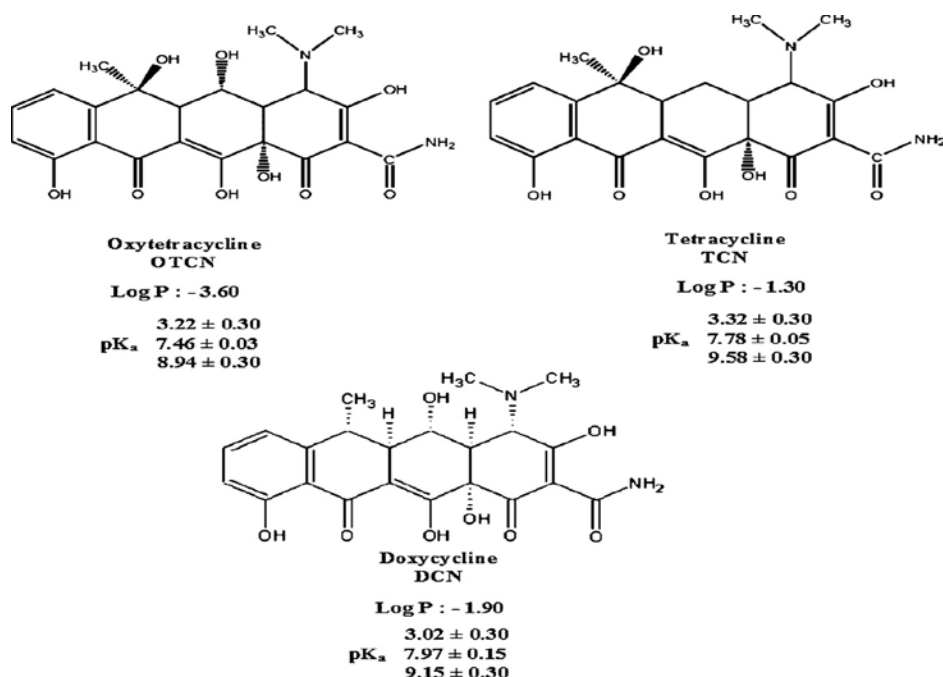
Til slutt ble metoden validert og resultater viste at oppkonsentreringsfaktoren var 70, 1060 og 200 for SAC, DIC og IBU henholdsvis. Relativ standardavvik for DAD metoden etter 15 forsøk med 5 $\mu\text{g/mL}$ prøver var 1.2, 1.3 og 0.8 % for SAC, DIC og IBU (intra-dag repeterbarhet) henholdsvis. Inter-dag repeterbarhet verdier (n=3; 5 dager) var 1.8, 1.7 og 1.1 %. For FLD, relativ standardavvik for 15 forsøk med 0,1 $\mu\text{g/mL}$ av SAC og 0,025 $\mu\text{g/mL}$ for IBU (intra-dag repeterbarhet) var henholdsvis 1,5 og 1,8 %. Inter-dag repeterbarhet (n=3, 5 dager) var henholdsvis 1,8 og 2,3 %.

Ekstraksjonstiden for de sure legemidlene var relativt kort (15 minutter) og kan sammenlignes med tradisjonelle ekstraksjonsmetoder [12]. En ekstraksjonstid på 15 minutter er kort i HF-LPME-sammenheng. Prosedyren er ganske enkel og bruker standard prosedyre for tre-fase HF-LPME. Ekstraktene var ikke helt rene, da flere matrikstopper kunne sees i kromatogrammene som er publisert i artikkelen. Oppkonsentreringsfaktoren var imponerende, spesielt for diklofenac og ibuprofen hvor det ble oppnådd henholdsvis 1060 og 200 ganger oppkonsentrering. Utbyttene var mellom 82-99 % for ekstraksjon fra urinprøver med innhold av IBU, SAC og DIC. Det ble brukt lite organisk løsemiddel og kostnad per analyse var lav. Valideringsresultater var innenfor kravene til FDA guidelines [14]. LOQ er ikke oppgitt. LOD til IBU, SAC og DIC er lavere enn terapeutisk relevante konsentrasjoner [15]. Legemidlene som ble ekstrahert og analysert i denne studien er blitt nøye studert gjennom tiden ved hjelp av andre ekstraksjons- og analyse metoder. Studien ble valgt siden representerer ekstraksjon av sure legemidler.

4.1.6 HF-LPME og polare stoffer

Tetracykliner er en gruppe legemidler som er veldig polare. Polare legemidler kan ekstraheres ved hjelp av HF-LPME. I et forsøk ble det brukt 10 % (w/v) Aliquat-336 som *carrier* for å ekstrahere polare legemidler ved HF-LPME [19]. For å utføre analysen brukte de en løsning av 1-oktanol og Aliquat-336 som væskemembran immobilisert i porene til

hullfiberen. Akseptorfasen var en blanding av 24 µl 0,1 M fosforsyre og 1,0 M natriumklorid med pH 1,6. Legemidler ble ekstrahert fra prøver som storfe melk, humant plasma og vandig løsning. Figur 13 viser kjemisk struktur til noen av tetracyklinene.



Figur 13: Struktur og kjemisk sammensetting av valgte tetracykliner [19].

Metoden ble slik utført:

Stamløsninger for hvert legemiddel ble klargjort i en konsentrasjon på 1000 mg/L ved å bruke HPLC grad metanol. Blandet standardløsninger av tetracykliner i konsentrasjoner av 5 og 20 mg/L for hvert legemiddel ble klargjort ved å fortynne dem i deionisert vann.

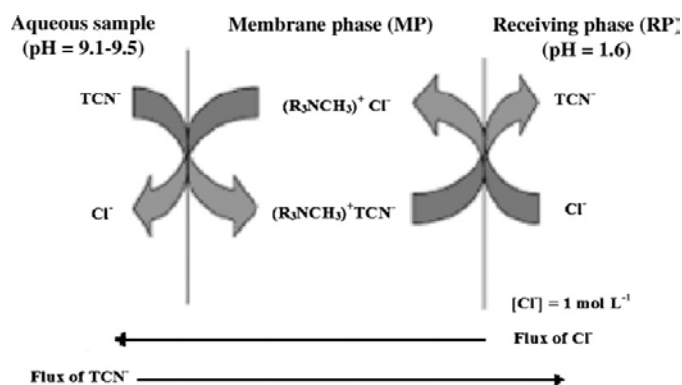
Deretter ble løsningene kjølt ned og oppbevart ved 4 °C. Blandet standardløsninger for daglig bruk i konsentrasjon µg/L skala av tetracykliner ble daglig klargjort ved å tilsette fosforsyre til løsningen. Væskemembranen ble laget ved løsningen av Aliquat-336 i oktanol.

En 8,8 cm lang hullfiber med 0,2µm porestørrelse, 600 µm intern diameter og 200 µm veggtykkelse ble brukt som membran. Hulrommet til hullfiberen ble fylt med akseptorfasen og hver hullfiber ble brukt en gang. Hver hullfiber ble ultralydbehandlet i 5 sekunder i aceton for å fjerne mulige forurensninger. Deretter fjernet de hullfiberen fra aceton og ventet til at løsningen fordampet. Intern volum av hullfiberen var ca. 24 µl og begge endene til hullfiberen ble koblet til en mikrosprøytesnål. Mikrosprøyten ble brukt til å introdusere akseptorfasen inn i hulrommet til hullfiberen, til å suspendere hullfiberen inn i løsningen og til å injisere ekstraktet inn i en HPLC injektor.

For hvert eksperiment ble 11 ml av vandig prøveløsning som inneholdt legemidler og 0,05 M fosforsyre (pH mellom 9,1 og 9,5) pipetert over i en 12 ml vial. Vialen ble plassert på en magnetrører og løsningen ble omrørt under eksperimentet. For hver ekstraksjon ble 25 µl av akseptorløsningen injisert i hulrommet til hullfiberen som på forhånd hadde blitt dyppet ned i organisk løsning i 10 sekunder og videre dyppet ned i vann i 10 sekunder for å fjerne overskuddet av organisk løsningsmiddelet fra overflaten til fiberen. Ekstraksjonen ble gjennomført i 35 minutter. Deretter ble hullfiberen fjernet fra vandig løsning og akseptorløsningen ble trukket tilbake inn i mikrosprøyten og tilslutt ble den injisert inn i HPLC instrumentet.

Tetracykliner er polare molekyler. De kan danne komplekser med metalioner og kan binde seg sterk til silanol grupper i HPLC kolonner [19]. Eksperimenter med forskjellige mobilfaser i HPLC kolonnen viste at man får symmetriske topper og mindre hale dannelse ved å bruke oksalsyre i mobilfase i omvend-fase kolonne. I tillegg til polare egenskaper er tetracykliner hydrofile komponenter med høy oppløselighet i vandig media. De har både syre og base egenskaper, og derfor kan de eksistere i forskjellige form avhengig av pH i løsningen og deres pKa verdi.

pKa verdien for tetracykliner er ca. 3-4, 7-8 og 9-10 [19]. I henhold til pKa verdien er tetracykliner positivt ladet i pH områder under 2-3. Når pH verdien øker vil tetracykliner bli til zwitterioner og ved høy pH vil de få negativ ladning og blir i anionisk form. Derfor er direkte HF-LPME basert på passiv transport av tetracykliner fra vandig prøve vanskelig. Fordelen med bruk av Aliquat-336 er at *carriren* holder seg i kationisk form uansett pH-verdi. Det viste seg at tilstedeværelsen av et anion som Cl^- som motion kan fremme tilbakeekstraksjon av tetracykliner. Figur 14 viser en forenklet mekanisme av transport av tetracykliner over til hullfiber membranen som inneholder Aliquat-336.



Figur 14: Foreslått mekanisme for ekstraksjon av tetracykliner med tre-fase HF-LPME [19].

For validering av metoden ble det plottet kalibreringskurver av 11 forsøk i konsentrasjonsområder 0,5-1000 µg/L. Alle standardprøvene ble ekstrahert ved foreslått metode som ble nevnt tidligere. Hvert forsøk ble gjentatt tre ganger. Nøyaktigheten av metoden ble målt ved å utføre tre repeterbare ekstraksjoner av prøve med konsentrasjon på 50 µg/L og RSD verdier var i område 4,3-8,9 %. Utbytte varierer fra 82,5 % - 116,3 %. Dette gjelder tre typer tetracykliner som er testet i studien. Korrelasjonskoeffisienten ble regnet ut å være $r^2 > 0,99$.

Med denne metoden utviklet de en Carrier-basert HF-LPME metode for analyse av polare amfotære molekyler fra komplekse prøver som melk og biologiske væsker. Sammenlignet med tradisjonelle metoder har denne metoden lavere deteksjonsgrense, høyere oppkonsentrering, god presisjon og linearitet. Metoden viste at polare stoffer kan ekstraheres ved HF-LPME og gir gode resultater. Instrumentet kan enkelt settes opp og kostnaden per analyse er lav.

I dette forsøket ble ekstraksjonen utført på 35 minutter. Sammenlignet med andre tradisjonelle metoder som SPE og LLE var ekstraksjonstiden noe lang [12]. Prosedyren til ekstraksjonen er enkel, men SLM og akseptorløsning klargjøringen krever mer laboratoriarbeid. Det brukes en carrier-løsning som skal øke passasje av tetracykliner over til organisk membran. Ekstraktene inneholdt flere matrikskomponenter fra plasma, som kunne observeres som topper i kromatogrammene. Utbyttene fra reelle prøver som melk, plasma og vandig standardløsning varierte fra 82,5 % - 116,3 %. Det ble brukt svært lite organiske løsningsmidler i denne metoden. Kostnaden per analyse var lav.

Valideringsresultatene var i samsvar med FDA guidelines [14]. Lineariteten ble observert med r^2 over 0,99, RSD verdiene var under 15 %. LOQ var gitt til å være 0,5 ng/ml for oksytetracyklin og tetracyklin, og 1 ng/ml for doksisyklin. Disse verdiene er under terapeutiske konsentrasjoner for tetracykliner og metoden anser derfor for å kunne dekke det terapeutisk relevante konsentrasjonsområdet [15]. Jeg synes at denne studien er relevant for denne oppgaven siden den presenterer anvendelse av HF-LPME for polare stoffer.

4.1.7 HF-LPME og automatisering

Det finnes flere måter å ekstrahere legemidler eller andre stoffer av interesse ved HF-LPME. I en artikkel ble automatiseringsmuligheten av flere HF-LPME teknikker vurdert [20]. Selv

om enkelte stoffer som ble ekstrahert i denne artikkelen ikke er legemidler men artikkelen ble valgt for å vise arbeid som ble utført for å automatisere HF-LPME.

Teknikker som statisk *headspace* (HS-HF-LPME), dynamisk eksponert HS-HF-LPME, ikke-dynamisk eksponert HS-HF-LPME, statisk direkte nedsenket HF-LPME (DI-HF-LPME), dynamisk DI-HF-LPME og to-fase hullfiber HF-LPME (HF-LPME) ble utført automatisert ved et *autosampler* apparat og faktorer som temperatur, valg av ekstraksjonsløsningsmiddel, løsningsmiddelvolum, stempelets bevegelsesratio og ekstraksjonstiden ble undersøkt. Alle metoder ble utført i kombinasjon med gasskromatografi.

Alle HF-LPME prosedyrer inkludert oppfylling av ekstraksjonsløsningsmiddel, overføring av prøver og omrøring av den, uttak av løsemiddel til sprøyten og introduksjon av organisk fase inn i injektor ble gjort av et *autosampler* apparat.

- *Headspace* HF-LPME:

Stamløsninger av BTEX (benzen, toluen, etylbenzen, o-oksylen) med en konsentrasjon på 870 µg/ml ble laget i metanol. Standard løsninger av BTEX med konsentrasjon på 870 ng/ml ble laget daglig og plassert i *autosampler*. Tre typer HS-HF-LPME teknikker ble undersøkt: statisk, dynamisk eksponert og ikke-dynamisk eksponert.

a - Statisk HS-HF-LPME

For statisk HS-HF-LPME ble 1 µl 1-oktanol brukt som organisk løsningsmiddel. En 10 ml prøve vial som inneholdt 4 ml vandig løsning av 870 ng/ml BTEX ble overført fra prøvebrett til en vibrator med kontrollert temperatur. Løsningen ble omrørt i 2 minutter ved 500 rpm og deretter ble en 10 µl sprøyte som var fylt med 1 µl 1-oktanol stukket gjennom lokket og sakte ble en dråpe av 1 µl 1-oktanol eksponert inn i *headspace* av vialen. Etter ulike ekstraksjonstider ble det organiske løsningsmiddelet sakte trukket tilbake inn i sprøyten og introdusert inn i en GC/MS instrument for analyse.

b - Dynamisk eksponert HS-HF-LPME

Metoden ble utført slik: vialen ble omrørt i 2 minutter ved 500 rpm av en vibrator og etterpå ble sprøyten fylt med 1 µl 1-oktanol stukket gjennom i gummilokket på vialen og stemplet til sprøyten ble sakte dyttet ned for å eksponere 1 dråpe av 1 µl 1-oktanol in i *headspace* av vialen i forskjellige ekstraksjonstider. Deretter ble mengde 1-oktanol sakte tilbaketrukket inn i sylindren til sprøyten. Etterfølgende ble vialen omrørt i forskjellige tidsperioder ved 500 rpm og etterpå ble dråpen eksponert og tilbaketrukket om igjen. Prosedyren ble gjentatt flere

ganger med forskjellige tider før 1 µl organisk 1-oktanol ble analysert av en GC/MS instrument.

c - Ikke-dynamisk eksponert HS-HF-LPME

For denne metoden ble 1 µl *n-undecane* brukt som organisk løsningsmiddel og prosedyren var lik dynamisk eksponert HS-HF-LPME. Forskjellen var at løsemiddelet ble flyttet inn i sylindere til sprøyten og en mengde tilsvarende 5 µl av gassen som var i *headspace* overflaten av vialen ble trukket inn i sylindere og dyttet ut igjen etter 5 sekunder. Etter å gjenta denne delen av prosedyren flere ganger ble 1 µl *n-dodekan* analysert ved GC/MS.

- Direkte nedsenket HF-LPME

Lagerløsningen av PAH (*acenaphthen*, fluoren, fluoranten og pyren) ble laget med en konsentrasjon på 100 µg/ml i metanol. Standard løsninger hadde en konsentrasjon på 100 ng/ml og ble klargjort daglig i rent vann fra lagerløsningen. Både statisk og dynamisk teknikk ble undersøkt.

a - Statisk direkte nedsenket HF-LPME

1 µl 1-oktanol ble brukt som organisk løsningsmiddel. En 10 ml prøve vial som inneholdt 100 ng/ml vandig løsning av PAH ble overført fra prøvebrettet til en vibrator og ble omrørt for 2 minutter ved 500 rpm. Deretter ble en 10 µl sprøyte fylt med 1 µl 1-oktanol og trukket sakte gjennom lokket til vialen for å eksponere 1 µl 1-oktanol direkte i prøveløsningen (0,1 µl/s). Etter forskjellige ekstraksjonstider ble løsningen sakte trukket tilbake inn i sprøyten og analysert ved GC/MS instrument.

b - Dynamisk direkte nedsenket HF-LPME

Her ble 1 µl *n-undecane* brukt som organisk løsningsmiddel. Mens prøven ble omrørt ble en 10 µl sprøyte fylt med 1 µl *n-undecane*, trukket gjennom lokket og 5 µl prøveløsning ble trukket sakte gjennom sylindere til sprøyten. Prøveløsningen ble etter 5 sekunder injisert tilbake til vialen. Dette ble gjentatt flere ganger. Prøveløsningen ble omrørt for 1 minutt etter hvert 10. forsøk. Til slutt ble det organiske løsningsmiddelet analysert ved GC/MS instrument.

- Hullfiber HF-LPME

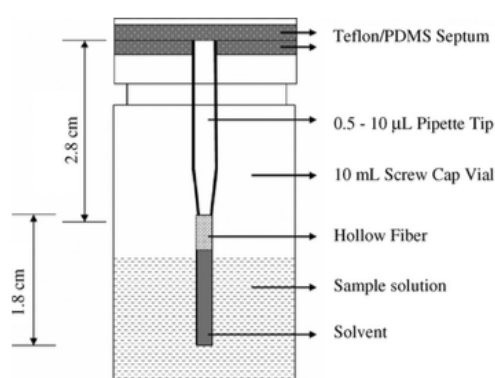
4 ml 100 ng/ml prøveløsning med BTEX ble brukt for denne metoden. En hullfiber ble

montert på toppen av en pipette og enden av fiberen ble forseglet med mekanisk trykk.

Praktisk lengde for fiberen ble målt til 1,5 cm.

Først ble vialen fylt med 4 ml PAH løsning, deretter ble 20 μ l av 1-oktanol injisert inn i hullfiberen ved hjelp av en sprøyte fra *autosampler*. For å unngå luftbobler ble *autosampleren* programmert slik at sprøytespissen stoppet 1 mm fra bunnen av hullfiberen.

Etter at hullfiberen var fylt med 20 μ l løsemiddel, ble prøvevialen automatisk overført til en vibrator med temperatur kontroll og omrørt ved 750 rpm og 30 °C. Deretter ble 2 μ l av det organiske løsningsmiddelet sakte trukket tilbake inn i sprøyte og 1 μ l av løsningen ble analysert ved GC/MS. Figur 15 viser skjematisk oppsett av ekstraksjonsenheten.



Figur 15: Skjematisk oppsett av HF-LPME instrument [20].

Resultater viste at i statisk HS-HF-LPME var ekstraksjonsmengde av BTEX konstant etter ekstraksjon i 5 minutter. Presisjon ble vurdert å være ganske god sammenlignet med ikke automatisk utførelse av metoden selv uten å bruke internstandard for å forbedre presisjon. Tabell 3 viser presisjonsverdiene for alle metoder brukt i denne studien. Det viste seg at økning i mengde organisk løsningsmiddel kan forbedre ekstraksjonseffektivitet. Effekt av temperatur ble undersøkt ved temperatur mellom 30-60 °C. Resultater viste at økende temperatur reduserer ekstraksjonsutbytte.

Tabell 3: Masseopptak og presisjon av full automatisert HS-HF-LPME teknikker [20]

	Mass uptake (ng) (RSD, %; n = 3–6)			
	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	<i>o</i> -Xylene
Static (1 µL) ^a	44.4 (2.6)	132.8 (4.2)	343.4 (3.0)	354.8 (4.2)
Static (2 µL) ^a	88.7 (0.8)	238.4 (1.6)	498.5 (1.2)	474.0 (2.1)
Static (3 µL) ^a	131.6 (2.0)	319.0 (2.1)	550.5 (1.9)	483.5 (2.5)
Static (1 µL, 40 °C) ^a	33.7 (4.1)	99.2 (1.5)	280.7 (1.5)	293.0 (3.4)
Static (1 µL, 50 °C) ^a	30.5 (2.3)	84.1 (4.0)	238.5 (2.1)	265.8 (3.7)
Static (1 µL, 60 °C) ^a	23.0 (2.5)	66.2 (1.7)	180.9 (2.5)	220.1 (3.0)
Static (1 µL) ^a (saturated with salt)	131.3 (4.6)	343.5 (4.0)	682.9 (2.5)	761.0 (1.4)
Exposed dynamic ^b	83.1 (2.1)	257.5 (3.3)	617.3 (1.6)	640.3 (1.1)
Exposed dynamic ^c	82.2 (0.6)	266.9 (4.5)	638.5 (4.8)	642.6 (5.3)
Exposed dynamic ^d	134.4 (1.5)	389.5 (1.0)	862.7 (2.2)	868.3 (0.7)
Unexposed dynamic ^e	38.0 (12.0)	118.0 (10.9)	297.1 (9.5)	292.6 (8.1)

Intern standard ble ikke tilsatt for å forbedre presisjon. Temperatur 30 °C

- a) 1-oktanol ekstrahert i 5 minutter, b) 1 µl 1-oktanol eksponert i 1 minutt og gjentatt 10 ganger
c) 1 µl 1-oktanol eksponert 20 s, rystet i 10 s og gjentatt 30 ganger d) 1 µl *n*-undecane eksponert i 1 minutt, rystet i 1 minutt og gjentatt 10 ganger e) 1 µl *n*-undecane, 10 µl/s, prøveløsningsvolum 5 µl, 60 ganger ekstraksjonssykluser, rystet i 1 minutt etter hver 10. gang

For dynamisk eksponert HS-HF-LPME viste det seg at systemet når likevekt etter å gjenta prosedyren 10 ganger. Sammenlignet med tidligere studier bruker denne metoden kortere tid, siden i tidligere studier måtte prosedyren gjentas ca. 30 ganger for å oppnå liknende resultater [20]. Resultatene viste at presisjonen var akseptabel selv uten bruk av internstandard (tabell 4). Det viste seg at mengde analytt som ble ekstrahert ved denne metoden var 2 ganger mer enn mengde analytt som ble ekstrahert ved statisk HS-HF-LPME metoden.

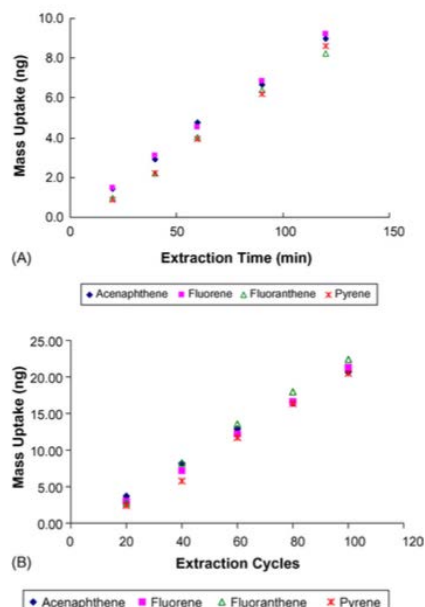
For ikke-dynamisk eksponert HS-HF-LPME viste det seg at stempelhastigheten påvirket ekstraksjonseffektiviteten, og derfor bør denne optimaliseres eksperimentelt. En annen faktor som påvirker resultatene er viskositeten til det organiske løsningsmiddelet. Luftboble dannelse er en ulempe som skjer ved bruk av løsningsmiddel med høy viskositet. Dermed ble det bestemt å bruke *n*-undecane istedenfor 1-oktanol som har høyere viskositet.

Eksperimenter viste at man oppnår bedre resultater ved å ha stempelhastighet på 10 µl/s [20]. Høyeste ekstraksjonsmengde ble oppnådd etter å gjenta prosedyren 60 ganger. Men presisjonen (tabell 3) var ikke like god som for dynamisk eksponert HS-HF-LPME og oppkonsentreringsfaktoren var mye lavere enn for dynamisk eksponert HS-HF-LPME.

RSD verdien var i område 5,5-17,7 % når metoden ble utført manuelt og 5,5-16,4 % når metoden ble utført semi-automatisert.

Resultater for eksperimentet med statisk direkte nedsenket HF-LPME viste en relasjon mellom mengde analytt som ble ekstrahert og ekstraksjonstid. Figur 16 under viser at ekstraksjonstiden kan bli opp til 120 minutter og mer. Presisjonen for metoden var god og i

område 3,3-4,9 % når temperatur var 25 °C. RSD var lavere enn 5 % selv uten å ha brukt internstandard. Det viste seg at temperatur økning har en positiv effekt på masseopptaket siden høyere temperatur vil akselerere diffusjon av analyttene.



Figur 16: Ekstraksjonstiden for ekstraksjon av PAH ved DI-HF-LPMEA) statisk DI-HF-LPME, B) dynamisk DI-HF-LPME [20].

Som ble nevnt tidligere er dynamisk DI-HF-LPME prosedyren ganske lik ikke-dynamisk eksponert DI-HF-LPME prosedyre unntatt det at prøven som ligger i sprøyte sylindren er i vandig løsning. Ved bruk av 1-oktanol oppsto det luftbobler igjen selv ved injiseringshastighet ned til 0,5 µl/s og dermed har de brukt *n-undecane* som organisk løsningsmiddel. Den beste ekstraksjons effektivitet ble oppnådd når hastigheten var på 1 µl/s. Det viste seg at temperaturøkning forbedret ekstraksjonseffektiviteten. Ved forsøk når temperatur var 25 °C var RSD verdier i område 3,7-4,3 %.

For å automatisere hullfiber HF-LPME valgte de å bruke prosedyren hvor hullfiberen sitter fast på en kanyle og kan bli omrørt av en vibrator. Hastigheten på vibratoren ble satt på maksimum siden rask omrøring kan forbedre massetransporteffektiviteten av metoden. Ekstraksjonen oppnådd likevekt etter 45 minutter. Presisjonen av metoden er akseptert hvis ekstraksjonstiden er lang nok til ekstraksjonen oppnår likevekt. RSD verdier var i område 5,5-6,8 %. Tabell 4 viser oppkonsentreringsfaktorer og ekstraksjonseffektiviteten av flere fullautomatiserte HF-LPME metoder.

Tabell 4: Oppkonsentreringsfaktor og ekstraksjonseffektiviteten ved fullautomatiserte HF-LPME metoder [20]

	Concentration enrichment factors (extraction efficiencies, %)			
	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	<i>o</i> -Xylene
Static HS-LPME ^a	51 (1.3)	153 (3.8)	395 (9.9)	408 (10.2)
Static (1 µL) ^a (saturated with salt)	151 (3.8)	395 (9.9)	785 (19.6)	875 (21.9)
Exposed dynamic ^b	154 (3.9)	448 (11.2)	992 (24.8)	998 (25.0)
Unexposed dynamic ^c	44 (1.1)	136 (3.4)	341 (8.5)	336 (8.4)
	Acenaphthene	Fluorene	Fluoranthene	Pyrene
Static DI-LPME ^d	117 (2.9)	124 (3.1)	113 (2.8)	102 (2.6)
Dynamic DI-LPME ^e	249 (6.2)	261 (6.5)	234 (5.9)	217 (5.4)
HF-LPME ^f	123 (61.5)	142 (71.0)	176 (88.0)	174 (87.0)

- a) 1 µl 1-oktanol ekstrahert i 5 minutter ved 30 °C, b) 1 µl *n*-undecane eksponert i 1 minutt, rystet i 1 minutt og gjentatt 10 ganger ved 30 °C c) 1 µl *n*-undecane, 10 µl/s, prøveløsningsvolum 5 µl, 60 ganger ekstraksjonssykluser, rystet i 1 minutt etter hver 10. gang ved 30 °C d) 1 µl 1-oktanol ekstrahert for 60 minutter i 10 ml prøveløsning ved 50 °C e) 1 µl *n*-undecane, 10 µl prøveløsning, stempelhastighet 1 µl/s, prøveløsningsvolum 5 µl, 100 ganger ekstraksjonssykluser ved 50 °C f) 20 µl 1-oktanol, 4 ml prøveløsning, 750 rpm, 30 °C

Resultatene viste at man kan automatisere flere HF-LPME metoder og ekstraksjonsforhold kan bli optimalisert. Flere faktorer som påvirker resultater kan kontrolleres. For flyktige organiske stoffer vil man få bedre resultater ved å bruke dynamisk eksponert HS-HF-LPME sammenlignet med ikke eksponert dynamisk HS-HF-LPME. Dynamiske prosesser i DI-HF-LPME kan forbedre ekstraksjonseffektiviteten og presisjonen er ganske akseptabel men metoden er ikke egnet for komplekse prøver som blod og avløpsvann. Høyere ekstraksjonsutbytte oppnås ved HF-LPME og dynamisk eksponert HS-HF-LPME. Til slutt konkluderte de at full automatisert HF-LPME er en egnet metode for å analysere stoffer som ble brukt i forsøket.

Ekstraksjonstiden for ekstraksjon av analyttene ved forskjellige HF-LPME teknikker er ikke oppgitt i tall. Av tabeller i artikkelen kan man dog finne ut at ekstraksjonstidene varierte fra i underkant av 25 minutter og opp mot 125 minutter for statisk og dynamisk DI-HF-LPME, og fra ca. 5 minutter til 60 minutter for HF-LPME. Ekstraksjonsutbyttet (recovery) øker når ekstraksjonstiden øker. Prosedyren til statisk eksponert HS-HF-LPME, dynamisk eksponert HS-HF-LPME, ikke-dynamisk eksponert HS-HF-LPME, statisk direkte nedsenket HF-LPME og dynamisk direkte nedsenket HF-LPME krever høy grad av nøyaktighet hvis metoden skal utføres manuelt i laboratoriet. Grunnen til dette er muligheten for tap av løsemiddelet under eksperimentet. Ved automatisering er dette noe enklere hvis man har kontroll på stempelbevegelsen til sprøyten. For HF-LPME er prosedyren enklere, både ved manuell og

automatisert utførelse av metoden. Ekstraksjonsutbyttene er generelt lave for HS-HF-LPME og DI-HF-LPME metodene og verdiene varierer fra 1,3 % til 25 %. HF-LPME metoden derimot resulterte i høyere utbytte fra 61,5 % til 88 % (tabell 4). Når det gjelder oppkonsentrering viste resultatene at laveste oppkonsentreringsfaktor var 44 ganger og høyeste var 998 ganger. Sistnevnte verdi regnes som en meget betydelig oppkonsentrering. Det er ikke mulig å vurdere renheten av ekstraktene siden det ikke er oppgitt informasjon om dette i artikkelen i form av kromatogrammer. Det brukes lite løsemiddel i alle metodene og kostnaden per analyse er lav spesielt ved automatisert analyse hvor det er mulig med flere analyse per tidsenhet, noe som sparer tid og penger. RSD resultater er under 15 % i alle forsøk. Det er ikke oppgitt ytterligere data for validering av metodene i artikkelen. Studien ble valgt fordi den representerer mulige alternativer for automatisering av HF-LPME selv om kjemiske stoffer som ble brukt i studien ikke er legemidler.

4.1.8 HF-LPME og ioniske væsker

Fordeler og ulemper ved bruk av ioniske væsker i HF-LPME ble undersøkt i en studie og en ny metode ble utviklet for å ekstrahere sulfonamider fra vannprøver (avløpsvann, vannprøver fra gård og elv) og for å analysere dem med HPLC.

Hensikten med forsøket var å foreslå en ekstraksjonsmetode som skulle være egnet for ekstraksjon av sulfonamider siden sulfonamidrester finnes i lave konsentrasjoner i komplekse prøver. Eksisterende metoder bruker store mengder av løsningsmidler og er tidskrevende [21].

Metoden ble utført slik:

Sulfadiazin (SD), sulfamerazin (SM₁), sulfametazin (SM₂), sulfadimetoksin (SDM), og sulfametoksazol (SMZ) ble valgt som modellsubstanser. Stamlløsninger ble laget ved å løse 50 mg standard i 100 ml HPLC grad metanol. Prøveløsninger ble laget ved å fortynne stamlløsninger med vann. En 13 cm lang hullfiber ble vasket med aceton i ultralydbad og ble lufttørret før bruk. Hulrommet til hullfiberen ble fylt med vann og hullfiberen ble dyppet ned i den ioniske væsken [C₈MIM]PF₆ med 14 % TOPO (trioktylfosfin oksid) (w/v) i 5 minutter slik at denne ble immobilisert i porene til hullfiberen. Før ekstraksjonen settes i gang ble overflaten til fiberen skylt med vann for å fjerne overskudd av organisk løsningsmiddel.

NaOH pH 13 ble valgt som akseptorfase og løsningen ble injisert sakte inn i hulrommet til hullfiberen ved å bruke en sprøyte. Volumet til akseptorfasen ble målt til 25 µl. Etterpå ble begge endene til fiberen brettet sammen og forseglet med aluminiumfolie. Effektiv lengde til fiberen var på 12 cm. Deretter ble hullfiberen plassert inn i donorfase som i dette forsøket ble valgt å være 4 ml 0,02 M KH₂PO₄, pH 4,5 med 2 M Na₂SO₄. Ekstraksjonen ble utført i en 5 ml vial og den ble plassert på en vibrator og ble omrørt i 8 timer ved 300 rpm. Etter at ekstraksjonen var over, ble fiberen forsiktig fjernet fra prøveløsningen og forseglingen ble kuttet. En side av fiberen ble koblet til en sprøytespiss men en kanyle som var fylt med luft slik at løsningen ble pumpet ut fra den andre siden. Til slutt ble akseptorfasen injisert inn i et HPLC apparat for analyse.

Flere kriterier for organisk løsningsmiddel ble vurdert gjennom eksperimentet, faktorer som immobilisering av organisk løsemiddel i porene til hullfiberen, blandbarheten med vann og høyere løselighet av analytter i organisk fase enn i vandig fase. Basert på disse kriteriene ble tre typer organiske løsningsmidler, *n*-undecane, DHE og [C₈MIM]PF₆ testet under samme forhold. Tabell 5 viser resultatene av forsøket.

Tabell 5: Oppnådd oppkonsentreringsfaktor fra forsøk med forskjellige organiske løsningsmidler [21].

Organic membranes	SD	SM ₁	SM ₂	SMZ	SDM
DHE	3.3	3.9	4.8	9.0	9.1
<i>n</i> -Undecane	–	–	–	–	–
[C ₈ MIM][PF ₆]	4.5	5.6	5.5	12.5	11.2
DHE/4% TOPO	4.2	4.3	5.1	12.4	12.2
<i>n</i> -Undecane/4% TOPO	1.6	2.1	1.8	2.5	3.7
[C ₈ MIM][PF ₆]/4% TOPO	7.7	8.5	9.1	17.0	20.8
DHE/4% Aliquat 336	3.1	3.5	4.7	8.6	10.4
<i>n</i> -Undecane/4% Aliquat 336	–	–	–	–	–
[C ₈ MIM][PF ₆]/4% Aliquat 336	3.9	5.0	4.1	7.2	8.3

DP: 4 mL, pH 4.5 KH₂PO₄ solution spiked with 5 µg/L target compounds; AP: 10 µL, 0.1 M NaOH; stirring speed: 100 rpm; extraction time: 1 h.

Forsøket med *n*-undecane ga ingen resultat. Ingen av stoffene ble ekstrahert. Forsøk med DHE resulterte i bedre oppkonsentrering men oppkonsentreringsfaktoren (3,3-9,1) ble ikke akseptert. Oppkonsentreringsfaktoren ble høyere når [C₈MIM]PF₆ (4,5-12,5) ble brukt som SLM. For å oppnå enda høyere oppkonsentreringsfaktor ble TOPO blandet inn i [C₈MIM]PF₆ og det endte med at oppkonsentreringsfaktoren lå mellom 7,7 og 20,8. Derfor ble denne blandingen valgt som væskemembran i denne studien. Siden [C₈MIM]PF₆ har relativ høy viskositet vil dette påvirke masseoverføringshastigheten og dermed tok det relativ lang tid (8 timer) før ekstraksjonen var over i studien. Eksperimenter med pH i donorfase viste seg at maksimum ekstraksjonseffektivitet oppnås med KH₂PO₄ ved pH 4,5. Basert på

ekstraksjonsprinsipper for HF-LPME ble pH i akseptorfasen valgt å være over 10 for å hindre at analytten tilbakeekstraheres til donorfasen. Forsøk med forskjellige konsentrasjoner av NaOH viste seg at maksimum ekstraksjonseffektivitet ble oppnådd ved å bruke 0,25 M NaOH ved pH 13.

For å øke masseoverføring fra donor- til akseptorfase gjennom organisk membran har de undersøkt effekten av omrøring og rysting. Det viste seg at dannelsen av luftbobler under omrøring med magnetrør ved 300 rpm vil redusere repeterbarheten (RSD %: 0,3-11,5 %) og oppkonsentrering (18-35 ganger) sammenlignet med rysting ved 300 rpm som har bedre repeterbarhet (RSD % 0,2-7,1 %) og høyere oppkonsentrering (22-41 ganger). Dermed har de valgt å ryste løsningen isteden omrøring under eksperimentet.

Tabell 6 viser metodens nøyaktighet ved anvendelse på reelle prøver.

Tabell 6: Nøyaktighet ved analyse av forskjellige reelle prøver [21].

Samples	SD			SM ₁			SM ₂			SMZ			SDM		
	C ₀	C _s	R	C ₀	C _s	R	C ₀	C _s	R	C ₀	C _s	R	C ₀	C _s	R
Wastewater ^a	N.D.	4.94	98.7 ± 5.8	0.12	5.24	102.4 ± 6.4	N.D.	4.67	93.3 ± 8.6	N.D.	4.46	89.1 ± 6.7	0.22	5.06	96.8 ± 6.4
Wastewater ^b	N.D.	5.04	82.5 ± 7.2	0.18	5.48	99.6 ± 5.9	N.D.	5.31	86.9 ± 7.5	N.D.	4.35	82.2 ± 5.5	0.15	4.72	91.4 ± 8.7
Duckery water	N.D.	5.16	103.2 ± 5.5	N.D.	4.16	83.2 ± 7.3	N.D.	4.78	95.5 ± 6.7	N.D.	4.89	97.7 ± 8.4	N.D.	4.91	98.2 ± 6.1
Fishery water	N.D.	4.75	95.0 ± 6.3	0.26	4.75	95.0 ± 5.6	N.D.	4.88	97.5 ± 7.6	N.D.	4.84	96.8 ± 7.6	0.2	4.92	94.3 ± 6.9
Paddy water	N.D.	4.64	92.7 ± 7.8	N.D.	5.05	101.5 ± 8.3	N.D.	4.60	90.2 ± 8.4	N.D.	4.59	91.8 ± 8.1	N.D.	4.60	91.9 ± 7.8

Co: opprinnelig konsentrasjon av analytter, Cs: konsentrasjon av analytter ved å tilsette 5 µg/l målkomponent, N.D: ikke detektert

Valideringsresultater viste at lineariteten $r = 0,995-0,9998$, oppkonsentreringsfaktoren er i området 58-135, LOD for SD = 0,4 µg/L, SM₁ = 0,1 µg/L, SM₂ = 0,3 µg/L, SDM = 0,1 µg/L og SMZ = 0,1 µg/L. Fem vandige miljøprøver ble analysert for å sjekke anvendbarheten av metoden. En gruppe av prøver ble ekstrahert basert på foreslått metode, en parallell gruppe av prøver ble analysert etter å tilsette 5 µg/l av målkomponenter. Som vist i tabellen over ble SM₁ og SDM funnet i prøver fra gård mens de andre stoffer ikke ble funnet i noen prøver. Ekstraksjonsutbytte ble funnet til å være i området 82-103 % og metoden viste en god repeterbarhet med RSD verdier mellom 0,5-4,8 %.

Til slutt konkluderte de med at en ny metode basert på tre-fase hullfiber HF-LPME ble utviklet for ekstraksjon og analyse av sulfonamider fra miljøprøver. Ved å ha kontroll over pH verdien av donor og akseptorfase og tilsette TOPO vil metoden resultere i høy ekstraksjonseffektivitet, oppkonsentrering og prøverensing ved å bruke små mengder av prøver.

I denne metoden er ekstraksjonstiden 8 timer. Dette er veldig lang tid og lite praktisk. Prosedyren er enkel og er standard for tre-fase HF-LPME. Kromatogrammene viser at

ekstraktene er rene. Utbytte er i området 82-103 % som er akseptable verdier. Det samme er oppkonsentreringen som er i området 58-135 ganger. Det brukes lite organisk løsemiddel per analyse og kostnaden per analyse er lav med tanke på forbruk av utstyr og løsemiddel. Valideringsresultatene er innenfor kravene til FDA guidelines [14]. RSD verdier er under 15 % og LOD verdiene er ganske lave. Terapeutisk konsentrasjon for sulfametoksazol er 30-60 µg/ml og ved hjelp av denne metoden kunne de analysere stoffet med konsentrasjon på 0,1 ng/ml. Det ble ikke funnet verdier for terapeutiske konsentrasjon for de andre legemidlene som er analysert i artikkelen [15]. Legemidlene i denne studien ble ekstrahert fra ikke biologiske prøver men studien ble vurdert som aktuell for denne oppgaven siden viser forskjellige bruksområder av metoden i legemiddelanalyse.

4.1.9 Spenning som drivkraft i HF-LPME

Hensikten med denne metoden var å utvikle en rask og effektiv metode for isolasjon og oppkonsentrering av ladede analytter fra kompliserte biologiske prøver som humant plasma og urin og fra vandige prøver ved hjelp av elektrisitet [22]. Metoden ble kalt EMI eller EME (elektromembran isolasjon eller elektromembran ekstraksjon).

Ved å applisere 300 V d.c. fra 300 µl vandig donorløsning som inneholdt 10 mM HCl ble stoffer som petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol og loperamid ekstrahert gjennom en 200 µm væskemembran av 2-nitrofenyl oktyl eter som var immobilisert i porene til en hullfiber og inn i en 30 µl akseptorløsning av 10 mM HCl løsning som var inn i hulrommet til hullfiberen. Overføringen av analytter ble påtvunget av en elektrisk potensialforskjell over væskemembranen som resulterte i elektrokinetiske migrasjon av legemiddelsubstanser fra prøveløsningen til akseptorløsningen.

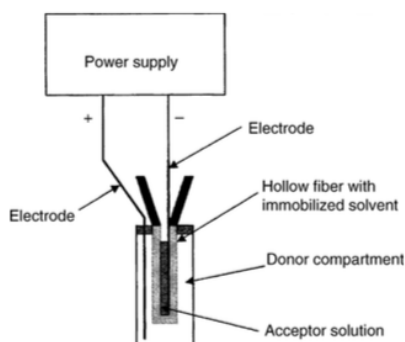
Metoden ble utført slik:

Ståltråd med en diameter på 0,2 mm ble brukt som elektroder. En 800 µl polypropylen vial med lokk og med 35 mm høyde og 5,2 mm diameter ble brukt som prøveholder. Hullfiberen hadde 1,2 mm intern diameter, 200 µm veggtykkelse og 0,2 µm porestørrelse. Hele prøveoppsettet ble omrørt under eksperimentet ved 1200 rpm av en vibrator.

300 µl prøveløsning ble surgjort med HCl (pH ≈ 2) og ble fylt inn i vialen og positiv elektrode ble plassert i prøven. En 3,1 cm lang hullfiber ble lukket i nederste ende og var koblet til en 2,2 cm pipettespiss fra toppen og denne ble satt inn gjennom lokket til vialen. Fiberen ble på forhånd dyppet i organisk løsemiddel i 5 sekunder og overskuddet av

løsningen ble fjernet med tørkepapir. 300 µl akseptorløsning ble fylt inn i hulrommet til hullfiberen og negativ elektrode ble plassert inn i akseptorløsningen. Til slutt ble hullfiberen med akseptorløsning plassert inn i prøveløsningen og spenning på 300 V fra en energikilde ble pålagt for 5 minutter for å gjennomføre ekstraksjonen. Deretter ble akseptorløsningen samlet opp ved hjelp av en mikrosprøyte og analysert ved CE.

Figur 17 illustrerer en enkelt tegning av EMI utstyret som ble brukt under eksperimentet.



Figur 17: Skjematisk illustrasjon av EMI utstyr [22].

Etter 5 minutter ekstraksjon med 300 V ble ekstraksjonsutbytte i område 70-79 % oppnådd og dette tilsvarte 7,0-7,9 ganger oppkonsentrering. Repeterbarheten av metoden ble undersøkt ($n=6$) for to konsentrasjoner (100 og 1000 ng/ml). Relativ standard avvik var i området 4,6-10,5 % for 100 ng/ml og 5,4-16 % for 1000 ng/ml. Linearitet i konsentrasjonsområdet 100 ng/ml–2,5 µg/ml ble testet og utmerket linearitet ble oppnådd med r^2 -verdier i området 0,99999 til 0,9988. Tabell 7 viser resultater som ble oppnådd under eksperimentet.

Tabell 7: EMI resultater og validerings data [22].

	Pethidine	Nortriptyline	Methadone	Haloperidol	Loperamide
Recovery (%)	70	70	79	72	76
Enrichment	7.0	7.0	7.9	7.2	7.6
Repeatability ($n=6$) 100 ng/ml	9.5	6.0	4.6	5.5	10.5
Repeatability ($n=6$) 1000 ng/ml	9.3	16.0	13.1	10.1	5.4
Linearity (r^2) 100–2500 ng/ml	0.9999	0.9992	0.9992	0.9988	0.9996

Eksperimentet viste for første gang at elektrokinetisk migrasjon gjennom en kunstig væskemembran kan være en effektiv og rask metode for isolering, oppkonsentrering, og rensing av legemiddelsubstanser fra kompliserte biologiske prøver. Metoden viste seg å være kompatibel med kompliserte biologiske prøver som plasma og urin. Tidlige studier ga tilfredsstillende valideringsdata [22].

Ekstraksjonstiden var på 5 minutter, noe som er relativt kort og kan sammenlignes med andre tradisjonelle metoder [12]. Prosedyren er enkel og utstyret kan lett monteres på en lab og ekstraksjonen kan enkelt utføres. Ekstraktene fra plasma og urin var ganske rene, med lite topper i elektroferogrammene fra matrikskomponenter. Ekstraksjonsutbyttet ved metoden var ganske høyt og er i område 70-79 %. På grunn av lavt faseforhold mellom prøve og mottakerløsning var oppkonsentreringen begrenset til 7-7,9 ganger. Typisk ved HF-LPME var lite bruk av organisk løsemiddel og lav kostnad per analyse. Valideringsresultatene var innenfor kravene til FDA omkring bioanalytisk metodevalidering [14]. Unntaket var RSD verdien for nortriptylin der konsentrasjonen var 1000 ng/ml. Da var RSD verdien 16 % (over 15 %). Lineariteten r^2 var fra 0,9999 til 0,9988. LOD og LOQ er det ikke oppgitt noe informasjon om. Studien ble presentert her fordi gjennom arbeidet ble ekstraksjonstiden betydelig kortere.

4.1.10 HF-LPME i farmakokinetiske studier

I en studie ble to-fase HF-LPME brukt som ekstraksjonsmetode for å studere farmakokinetiske effekten av echinakosider (ECH) i parkinsonsykdom fra plasmaprøver fra rotter [23].

Hensikten med studien var å utvikle en ny metode som skulle ekstrahere analytter effektivt og hindre at proteiner, andre endogene komponenter og urenheter som finnes i biologiske prøver ekstraheres sammen med analyttene.

Slik ble analysen utført:

Stamløsninger av ECH (5 µg/ml) og internstandard (2 µg/ml) ble laget ved å oppløse passende mengde av hver ren substans i en blanding av metanol og vann (50:50, v/v) og oppbevare dem ved 4 °C i kjøleskapet.

Rotter ble bedøvet av pentobarbital natrium og blod ble tappet fra magearterien i et rent heparinisert glassrør. Blank plasma ble separert ved umiddelbar sentrifugering av blod ved 4000 rpm i 10 minutter og ble oppbevart ved -20 °C. Frosset plasma ble tint til romtemperatur før bruk.

Hullfiberen hadde en indre diameter på 600 µm, porestørrelse på 0,2 µm, veggtykkelse på 200 µm og en porøsitet på 60 %. Fiberen ble kuttet i 8 cm lang biter. Hver bit ble brukt en

gang og før bruk ble de ultralydbehandlet i aceton for 5 minutter for å fjerne mulige kontaminanter.

0,2 ml plasma og 10 µl 20 ng/ml internstandard ble fylt i en konvensjonell prøvevial med skrulokk og silikontopp. Plasmaprøver ble fortynnet med ultrarent vann til en total volum på 5 ml med 1,0 % (w/v) NaCl. Deretter ble porene til hullfiberen fylt med organisk løsningsmiddel (n-oktanol) i 30 sekunder, og skylt med ultrarent vann etterpå for å fjerne overskuddet. Hver ende av hullfiberen ble koblet til en sprøyte nål (0,8 mm O.D) som på forhånd ble stukket gjennom silikontoppen. 15 µl akseptorløsning (n-oktanol) ble injisert inn i hulrommet til hullfiberen ved å bruke en 25 µl mikrosprøyte. Etterpå ble hullfiberen plassert i plasmaprøven for ekstraksjonen. Løsningen ble omrørt ved 1000 rpm i 10 minutter av en magnetrører ved romtemperatur. Deretter ble akseptorløsningen samlet opp ved hjelp av en mikrosprøyte og innholdet ble fordampet ved hjelp av en evaporator. Resten ble oppløst i 50 µl metanol og ble filtrert gjennom en 0,45 µm filter. Til slutt ble løsningen analysert ved hjelp av HPLC.

Flere faktorer som påvirker ekstraksjonen som for eksempel type organisk løsningsmiddel, omrøringshastighet, effekt av salt og ekstraksjonstid ble studert gjennom studien.

Høyeste ekstraksjonsutbytte ble oppnådd når n-oktanol ble brukt som organisk løsningsmiddel. Forsøk med flere omrøringshastigheter viste at ekstraksjonsutbyttet oppnår sitt maksimum ved 1000 rpm. Hastigheter over 1500 rpm ble ikke undersøkt grunnet luftboble dannelse. Effekt av tilsetning av salt ble undersøkt og resultatene viste at tilsetning av NaCl i området 0-5 % (w/v) øker ekstraksjonsutbyttet. Utover dette ble ikke ekstraksjonsutbyttet påvirket.

Effekt av ekstraksjonstid ble også studert. Eksperimenter med 2,5,10,15 og 20 minutter ekstraksjonstid viste at ekstraksjonsutbytte reduseres etter 10 minutter.

Resultater fra forsøket viste at lineariteten hadde en korrelasjonskoeffisient lik $r = 0,9998$ for konsentrasjonsområdet 5-750 ng/ml. Deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble målt til 2 og 5 ng/ml for ECH. Alle Intra-dag presisjonsverdier (RSD) var lavere enn 5,14 % og inter-dag presisjonsverdier var lavere enn 5,43 % i de tre konsentrasjonene som ble evaluert, nemlig 10, 100 og 500 ng/ml. Inter-dag og intra-dag nøyaktigheten ble også målt og verdiene ble funnet å være 94,3 % og 98,5 % for ECH. Gjennomsnittsverdien for ekstraksjonsutbytte gjennom studien var alltid høyere enn 94,9 % for ECH.

Oppkonsentreringsfaktoren ble målt 337 ganger for ECH.

I denne studien klarte de ved hjelp av metoden og kvantifisere ECH etter oral administrering og farmakokinetiske parametere kan sees i tabell 8.

Tabell 8: Farmakokinetiske data av ECH i rotter etter oral administrasjon (n=6) [23]

Parameter	Estimate (mean \pm SD)	
	Normal	Parkinson's disease
$T_{1/2}$ (min)	73.9 \pm 19.56	121.6 \pm 27.78**
T_{max} (min)	16.4 \pm 4.77	22.8 \pm 7.26
$AUC_{0-\infty}$ (ng h mL ⁻¹)	2759.3 \pm 79.46	3731.8 \pm 90.32**
CL (mL kg h ⁻¹)	0.35 \pm 0.05	0.13 \pm 0.04**
C_{max} (ng mL ⁻¹)	365.2 \pm 46.4	403.6 \pm 52.3*
MRT (h)	5.76 \pm 2.59	7.35 \pm 3.18*
V_d (L kg ⁻¹)	189.3 \pm 34.7	213.5 \pm 38.5

$T_{1/2}$: halveringstid, T_{max} : tiden til maksimum plasma konsentrasjon

$AUC_{0-\infty}$: areal under konsentrasjon-tid kurven, CL: eliminasjons *clearance*

C_{max} : maksimum plasma konsentrasjon, MRT: gjennomsnitt oppholdstid

V_d : distribusjonsvolum,

* sammenlignet med normal rotter P <0,05

** sammenlignet med normal rotter P <0,01

Til slutt konkluderte de med at en sensitiv, sikker, økonomisk og nøyaktig metode i kombinasjon med HPLC er utviklet for å bestemme plasmakonsentrasjonen av ECH i rotter etter oral administrering. Metoden ble brukt til å sammenligne ECH farmakokinetiske egenskaper i normale rotter med rotter som hadde parkinsonssykdom. Det viste seg at ECH kinetiske egenskaper i rotter med parkinsonssykdom er forskjellige fra friske rotter.

Ekstraksjonstiden i denne studien var 10 minutter. Dette er relativt raskt og kan sammenlignes med andre tradisjonelle ekstraksjonsmetoder som SPE og LLE [12].

Prosedyren var enkel og bruker prinsippet for to-fase HF-LPME. Kromatogrammene viste at ekstraktene var ganske rene og analyttene kunne lett gjenkjennes. Gjennomsnittverdien for utbytte var gitt å være høyere enn 94,9 %, og dette er høyt for HF-LPME. Det samme gjelder oppkonsentreringsfaktoren på 337. Det ble brukt svært små volum med organisk løsemiddel og kostnaden per analyse var lav. Valideringsresultater tilsier at metoden tilfredsstillende kravene til FDA guidelines ved å ha linearitet $r = 0,9998$, RSD lavere enn 5,14 % [14].

LOD = 2 ng/ml og LOQ = 5 ng/ml viser at veldig lave konsentrasjon av analytten kan måles ved hjelp av denne metoden. Echinakodiser har sitt opphav fra planter, men artikkelen ble ansett som relatert med oppgaven siden HF-LPME ble bruk i farmakokinetiske studier.

4.1.11 HF-LPME kombinert med derivatisering

Tre-fase HF-LPME med in-situ derivatisering i kombinasjon med HPLC ble brukt i en studie for bestemmelse av metforminhydroklorid (MH) i biologiske væsker som urin og plasma og fra vandige prøver [24]. Et nytt derivatiseringsreagens, pentafluorbenzoyl klorid (PFBC) ble brukt i denne studien. Donorfase inneholdt 600 µl 4 M NaOH og 100 µl 10 mg/ml PFBC i acetonitril, akseptorfase var 10 µl 100 mM HCl og organisk løsningsmiddel var diheksyleter. Omrøringshastigheten var 300 rpm, ekstraksjonstiden var 30 minutter og derivatiseringstemperatur var 70 °C [24].

Bestemmelse av MH i biologiske væsker er viktig for terapeutisk overvåkning av legemiddelet, bestemmelse av pasientens *adherence* og bioekvivalensstudier. På grunn av høy polaritet og sterke basiske egenskaper for MH, er lite data tilgjengelig for disposisjon av MH i biologiske væsker. Siden MH har høy løselighet i vann vil masseoverføring til organisk løsningsmiddel være vanskelig. De mente at løsningen til denne problematikken vil være derivatisering av metformin, slik at polariteten reduseres. Hensikten med denne metoden var å utvikle en HF-LPME metode med in-situ derivatisering for å bestemme MH i biologiske væsker og analysere dem ved HPLC-UV.

Fremgangsmåten til forsøket var slik:

Stamløsninger av metformin med konsentrasjonen 1000 µg/ml ble laget og oppbevart ved 4 °C. For daglig bruk fortynnet de løsninger fra stamløsninger i en 10 ml flaske som inneholdt 600 µl 4 M NaOH og 100 µl derivatiseringsløsning.

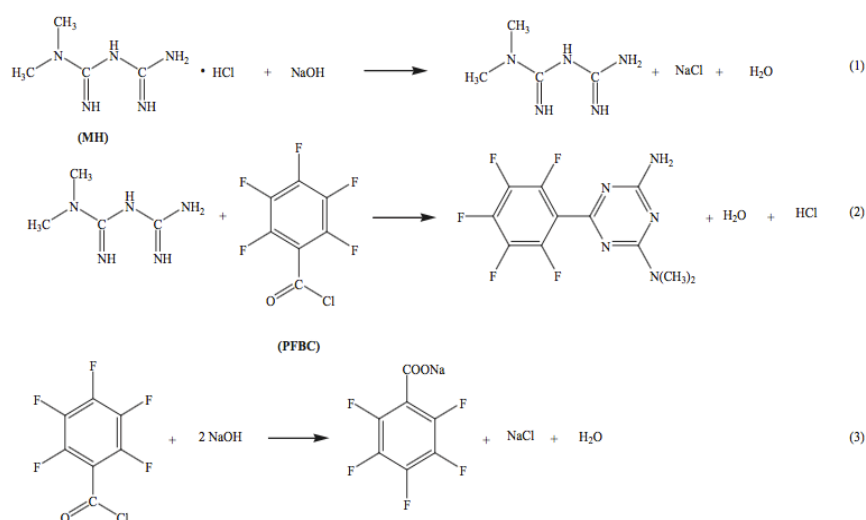
Plasmaprøver (2 ml) ble tilsatt MH i ønsket konsentrasjon og 200 µl 0,05 M HCl ble tilsatt til løsningen og blandingen ble rystet i 30 sekunder. 3 ml acetonitril ble tilsatt til blandingen som proteinfellingsreagens. Blandingene ble sentrifugert ved 1900 rpm i 15 minutter.

Supernatanten ble samlet opp og fordampet til tørrhet ved 40 °C under en strøm av nitrogen gass. Resten ble senere rekonstituert ved å bruke 100 µl av derivatiseringsløsningen og 600 µl av 4 M NaOH. Løsningen ble overført til en 10 ml flaske og fortynnet til merket med vann. Til slutt ble prøven tilsatt løsningen under optimale forhold som var: bruk av diheksyleter som organisk løsningsmiddel, bruk av 600 µl 4 M NaOH, bruk av 100 mM HCl som akseptorfase, bruk av 100 µl derivatiseringsløsning, ha en omrøringshastighet på 300 rpm, temperatur på 70 °C og ingen tilsetning av NaCl.

For å minimalisere at prøveløsningen påvirker resultater, ble 5 ml urin fortynnet til 10 ml med vann og deretter ble MH, derivatiseringsløsningen og NaOH tilsatt. Til slutt ble prøven brukt i HF-LPME.

Derivatiseringsprosessen var slik:

10 ml prøveløsning som var tilsatt derivatiseringsløsning og NaOH ble overført til en 12 ml vial som inneholdt en magnetrører. Hullfiberen var 4 cm lang, hadde 600 µm indre diameter, 200 µm veggtykkelse og 0,2 µm i porestørrelse. Fiberen ble bøyd i U form og ble dyppet ned i diheksyleter i 10 sekunder for å tette porene med organisk løsningsmiddel (immobiliseringsprosessen). Senere ble fiberen vasket med vann for å fjerne overskuddet av organisk løsningsmiddel. Hullfiberen ble plassert inn i vialen og 10 µl 100 mM HCl ble injisert inn i hulrommet til hullfiberen ved hjelp av en mikrosprøyte. Både derivatisering og ekstraksjon ble utført samtidig i 30 minutter mens løsningen ble omrørt og oppvarmet ved 300 rpm og 70 °C henholdsvis. Til slutt ble 5 µl av ekstraktet trukket inn i sprøyte og ekstraktet ble injisert inn i HPLC for analyse. Figur 18 viser derivatiseringsreaksjonen mellom MH og PFBC i basisk miljø.



Figur 18: Derivatiseringsreaksjon mellom MH og PFBC i basisk miljø [24].

Siden metforminhydroklorid har lav løselighet i organiske løsemidler var pre-derivatisering nødvendig for å oppnå høyt ekstraksjonsutbytte. Tre forskjellige derivatiseringsreagenser ble prøvd gjennom forsøket og det viste seg at høyeste utbytte ble oppnådd ved å bruke PFBC som derivatiseringsreagens.

På bakgrunn av egenskapene det organiske løsningsmiddelet skulle ha, ble det forsøkt åtte forskjellige organiske løsningsmidler for å oppnå høyt ekstraksjonsutbytte. Det viste seg at

diheksyleter resulterte i høyere ekstraksjonsutbytte enn de andre løsningsmidlene som ble brukt.

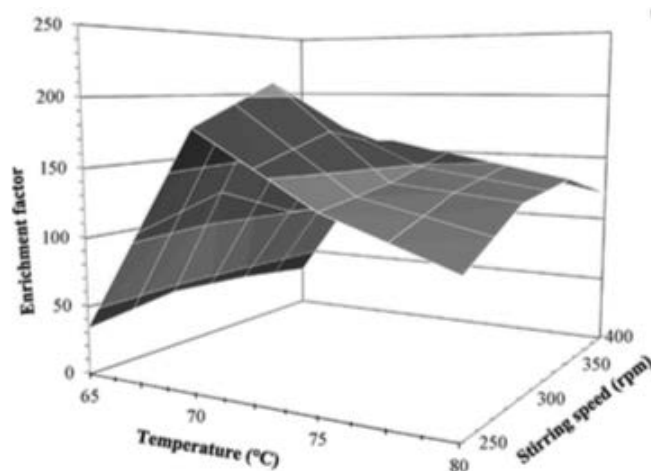
Det ble tidligere rapportert at derivatisering av metforminhydroklorid ved bruk av p-nitrobenzoyl klorid krever høy konsentrasjon av NaOH for å deionisere MH [24]. Grunnen til dette er sterk basisk egenskap og høy pKa verdi til metforminhydroklorid ($pK_a=12,4$). I tillegg brukes NaOH for å nøytralisere HCl (biprodukt) som blir dannet under derivatiseringsprosessen og hydrolyserer overskuddet av derivatiseringsreagenset til benzosyre derivater som blir oppløst igjen inn i donorfasen. Estimert pKa verdi for derivatisert metforminhydroklorid ble funnet å være $3,61 \pm 0,10$ [24]. For å oppnå godt ekstraksjonsutbytte valgte de å justere pH i donorfasen 2-3 enheter over pKa verdien. Det meste av NaOH forbrukes av PFBC og biproduktet HCl, og derfor har de valgt å bruke 4 M NaOH i volum området 300-800 μ l. Det viste seg at ekstraksjonsutbyttet blir forbedret når volum av NaOH øker til 600 μ l og reduseres deretter. Dermed har de valgt å bruke 600 μ l 4 M NaOH i eksperimentet.

Ved bruk av derivatiseringsagent ble det ikke observert noe økning i derivatiseringseffektiviteten i volum over 100 μ l. Derfor ble 100 μ l derivatiseringsløsning brukt i denne studien.

Akseptorfasen skulle ha lav nok pH (2-3 enheter under pKa verdien) for å øke løseligheten av basiske analytter og få dem til ionisert form for å hindre tilbakeekstraksjon inn i det organiske løsningsmiddelet.

Effekt av andre parametere som omrøringshastighet, temperatur, tid og tilsetning av salt ble undersøkt. Omrøring ble brukt for å øke utbytte og redusere tiden det tar for å oppnå likevekt. Det ble funnet ut at økning i temperatur begrenser bruk av høy omrøringshastighet [24]. Forskjellige temperaturer og omrøringshastigheter ble undersøkt i eksperimentet og det beste resultat ble oppnådd ved 300 rpm på 70 °C. Omrøring med hastigheter over 300 rpm viste seg å påvirke utbyttet på en negativ måte på grunn av bobledannelse. Forsøk viste at oppkonsentreringsfaktoren økte ved temperaturøkning og den nådde sitt maksimum ved 70 °C og ble redusert ved høyere temperatur. I tillegg økte temperaturer høyere enn 70 °C fordampingsprosessen av det organiske løsningsmiddelet. Effekt av ekstraksjonstiden på utbytte ble også studert og det viste seg at de hadde en økning i utbytte ved ekstraksjonstid opp til 30 minutter. Tilsetning av salt til prøveløsning (0-15 % w/v) ble studert og resultater viste at bedre ekstraksjonsutbytte oppnås ved å tilsette salt til donorfasen.

Figuren 19 viser effekt av temperatur og omrøringshastighet på oppkonsentreringsfaktoren.



Figur 19: Oppkonsentreringsfaktorens påvirkning av temperatur og omrøringshastighet [24].

Valideringsstudier ble utført og linearitet ble undersøkt ved å plote arealet av topper i forhold til analyttens konsentrasjon i konsentrasjonsområdet fra 1-1000 ng/mg. Resultater viste at $r^2 = 0,9998$, LOD = 0,56 ng/ml, LOQ = 1,68 ng/ml. RSD for seks ekstraksjoner med konsentrasjoner på 5,10,500 og 1000 ng/ml var i området 2,4-12 %.

For reelle prøver hadde de tilsatt MH til plasma i forskjellige volum fra 0,5 til 3 ml. Resultater viste at utbyttet ble redusert når prøvevolumet var større enn 2 ml. Derfor har de brukt 2 ml plasma for å studere utbytte i forskjellige konsentrasjoner. Til slutt ble utbytte beregnet å være fra 82,7-99,0 % for ekstraksjoner av plasmaprøver. Oppkonsentreringen ble kalkulert å være 210 ganger.

Tabell 9 viser oppnådd utbytte av in-situ HF-LPME-HPLC-UV av forskjellige prøveløsninger.

Tabell 9: Oppnådd utbytte fra forsøk med reelle prøver [24].

	$C_{added}(ng\ mL^{-1})$	$C_{found}(ng\ mL^{-1})$	Recovery (% \pm SD)
Plasma	1000	969.5	97.0 \pm 15
	500	413.5	82.7 \pm 13
	50	49.48	99.0 \pm 13
Urine	1000	1047	105 \pm 2.6
	500	522.5	105 \pm 9.1
	50	48.48	97.0 \pm 7.6
Tap water	500	489.5	97.9 \pm 8.1
Lake water	500	496.5	99.3 \pm 14

Ved hjelp av denne metoden klarte de å utføre tre-fase HF-LPME på metforminhydroklorid. Metoden innebærer derivatisering av analytten noe som øker log P-verdien og dermed øker mengden analytt som går over til akseptorfasen. Metoden er enkel og miljøvennlig og kan brukes til terapeutiske formål.

Ekstraksjonstiden var 30 minutter, noe som er relativt lang tid i forhold til tradisjonelle metoder som SPE og LLE [12]. Prosedyren var relativt komplisert, spesiell for klargjøring av prøveløsningen og tok ca. 15 minutter. For ekstraksjonen ble det benyttet standard prosedyre for tre-fase HF-LPME. Kromatogrammet viste en del andre topper enn metformin. Dette viste at flere matrikskomponenter ble ekstrahert sammen med analytten. Ekstraksjon av plasmaprøver resulterte i 82,7-99,0 % utbytte. Ved hjelp av denne metoden kunne analytten oppkonsentreres 210 ganger. Sammenlignet med andre tradisjonelle metoder ble det brukt veldig lite løsningsmiddel i HF-LPME og kostnaden per analyse var lav.

Valideringsresultatene var innenfor kravene til FDA guidelines [14]. RSD verdier var under 15 %, lineariteten $r^2 = 0,9998$. LOD og LOQ verdiene var under det terapeutiske vindu for metformin [15]. Metformin er et velstudert legemiddel og dens kjemiske og medisinske egenskaper er godt kjent. Denne studien ble valgt ut fordi den viser kompatibiliteten av HF-LPME med derivatisering.

4.1.12 Kan ultralyd forbedre HF-LPME utbytte?

HF-LPME i kombinasjon med GC ble brukt for bestemmelse av nikotin i plasma i en studie [25]. Metoden ble kalt "*high-throughput*" bestemmelse (H-U-HF-LPME) av nikotin i plasma ved ultralyd forbedret hullfiber mikroekstraksjon i kombinasjon med GC.

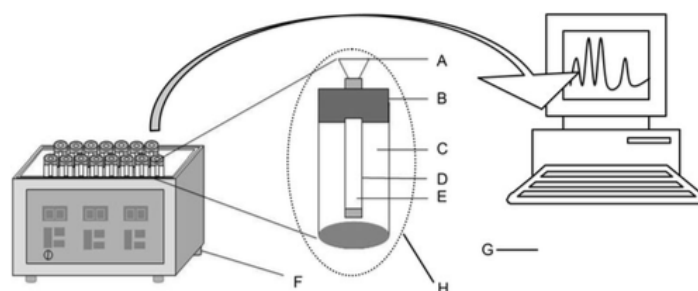
Hensikten med denne studien var å utvikle en forbedret HF-LPME metode og bruke den til å bestemme mengde nikotin i plasma. Flere parametere inkludert valg av akseptorfase, temperaturen til prøveløsningen, ultralyd frekvensen og dens styrke, mengde donorfase, ekstraksjonstiden, ionestyrke av prøveløsningen og konsentrasjon av prøven ble undersøkt i studien.

Basert på resultater ble nikotin ekstrahert fra 1,5 ml prøveløsning når ultralydstyrken var 50 W, frekvensen var 60 KHz, ekstraksjonstiden var 10 minutter, konsentrasjon av NaCl var 5 mol/L og temperaturen var 37 °C. Senere ble 0,5 µl av akseptorløsningen (n-oktanol) injisert i GC med flamme ionisasjonsdetektor (GC-FID) for analyse

Fremgangsmåten var slik:

En 3 cm lang hullfiber ble ultralyd behandlet tre ganger med metanol for å fjerne polymeradditiver fra membranen. En traktformet kontakt ble koblet til fiberen. 1,5 ml prøveløsning ble fylt i *autosampler* vialen. Fiberen ble forseglet ved mekanisk trykk etter at organisk løsningsmiddel ble injisert i fiberen ved hjelp av en mikrosprøyte. Flere

mikroekstraksjonsenheter ble laget og plassert i ultralydsonden for å utføre samtidige ekstraksjoner. Etter at ekstraksjonen var over ble ekstraksjonsenheter overført til et *autosampler* og 0,5 µl av akseptorløsningen ble automatisk injisert i en GC-FID for analyse. Figuren 20 viser en skjematisk illustrasjon av H-U-HF-LPME apparatur som ble brukt i studien.



Figur 20: Skjematisk illustrasjon av H-U-HF-LPME

A) traktformet kontakt B) *autosampler* vial med skrulokk C) prøveløsning D) porøs hullfiber
E) organisk løsningsmiddel F) ultralydenhet G) GC H) mikroekstraksjonsenhet [25].

For å studere effekt av prøveløsningen (matrikseffekten) ble plasmaprøver undersøkt med denne metoden. Plasmaprøver fra tre frivillige som har røyket i ca. 30 år ble skaffet. Hver av dem tok en sigarett før blodprøvetaking (6 ml). Blodet fra hver av dem ble sentrifugert straks ved 10000 rpm i 10 minutter og plasma ble overført til glass kolber merket med nikotin 1, nikotin 2 og nikotin 3.

For ekstraksjonsprosessen ble 4,5 ml plasma plassert i tre glassvialer og alle tre ble ekstrahert samtidig. Etter at ekstraksjonen var over ble alle vialene plassert i et *autosampler* for analyse med GC-FID. Konsentrasjon av nikotin i plasmaprøvene var 16, 23 og 18 µg/L. Dette ble sammenlignet med verdier fra tidligere studier/metoder [25] og samsvarer med dem. Analysen viste at plasmaprøven ikke påvirker resultatet i denne metoden.

For å velge organisk løsemiddel ble n-oktanol, toluen, karbon tetraklorid, n-heksan og n-heptan prøvd. Høyest ekstraksjonsutbytte ble oppnådd da n-oktanol ble brukt som organisk løsningsmiddel. For å velge optimal temperatur ble oppkonsentreringsfaktoren under forskjellige temperaturer fra 15-40 °C sammenlignet. Resultater viste at oppkonsentreringsfaktoren for nikotin var høyere ved høye temperaturer. Derfor ble ekstraksjonstemperatur valgt å være 37 °C.

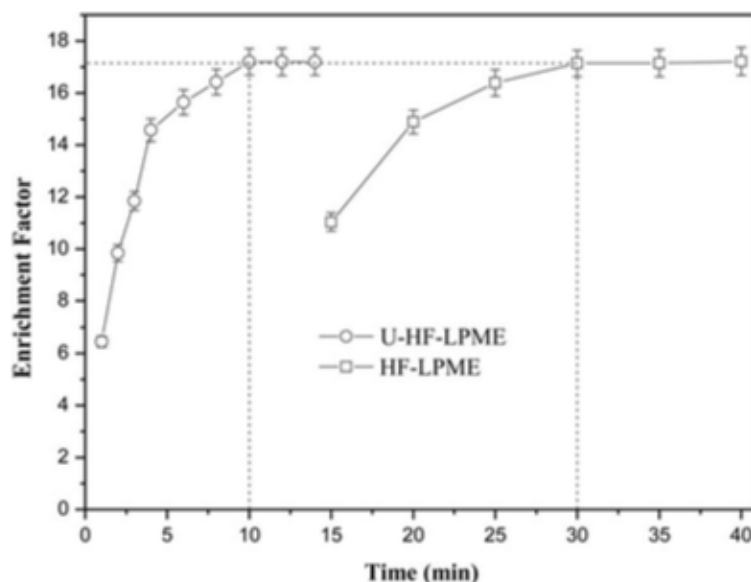
Nikotin har pyridin (pKa = 3,04) og pyrrolidin (pKa = 7,84) grupper [25]. Mengde ionisert nikotin har signifikant effekt på ekstraksjonsutbytte fra plasma og er pH avhengig. Derfor ble

effekten av pH på ekstraksjonsutbytte også studert. Resultater viste at høyeste oppkonsentreringsfaktor ble oppnådd ved pH 7,84. Siden pH 7,4 er biologisk pH ble dette valgt for analysen.

Effekt av ultralydstyrken og frekvens ble også vurdert. Resultater viste at korteste likevektid for ekstraksjon ble oppnådd ved styrke på 50 W og frekvensen på 60 kHz.

Effekt av ekstraksjonstiden ble vurdert gjennom studien. I HF-LPME vil masseoverføringen av måleanalytter mellom to ikke blandbare væsker påvirke ekstraksjonstiden. Målet med å bruke ultralyd var å akselerere overføringen av analytter fra prøven over til det organiske løsemiddelet, siden ultralydprosessen produserer mekanisk vibrasjon slik at diffusjonshastigheten vil øke. Videre kan tykkelsen av væskefilmen mellom vandig fase og n-oktanol reduseres, noe som resulterer i mindre masseoverføringsmotstand og høyere utbytte [25]. Resultater viste at etter 10 minutter ekstraksjon av nikotin med H-U-HF-LPME var oppkonsentreringsfaktoren det samme som etter 30 minutter ekstraksjon av nikotin med HF-LPME. Dermed valgte de å ekstrahere nikotin med H-U-HF-LPME i 10 minutter.

Figur 21 viser oppkonsentreringsresultater av ekstraksjon av nikotin med HF-LPME og H-U-HF-LPME.



Figur 21: Tidsprofilen av H-U-HF-LPME (ultralydstyrke 50 W, ultralydfrekvens 60 kHz, pH 7,4 , NaCl konsentrasjon 5 mol/L, temperatur 37 °C) og HF-LPME (omrøringshastighet 600 rpm, pH 7,4, NaCl konsentrasjon 5 mol/L, temperatur 37 °C) [25]

Effekt av volumet til organiske løsemiddelet på ekstraksjonsutbytte ble også vurdert.

Varierende mengder av volum i området 10-50 µl ble evaluert, mens konsentrasjon av vandig

nikotin var 20 µg/L. Fem mikroekstraksjonsenheter ble klargjort og ble samtidig ekstrahert i 10 minutter. Etter at ekstraksjonen var over ble alle enheter overført til et *autosampler* til GC-FID instrument for analyse. Resultater viste at oppkonsentreringsfaktoren hadde nesten samme verdi (fra 15-17 ganger). For å minimalisere feilen stilte de volumet av ekstraksjonsmiddelet inn i dette området. Det ble valgt å bruke 20 µl n-oktanol i denne studien siden ytterligere reduksjon ville vanskeliggjøre oppsamling av ekstraktet og redusere eksperimentets reproduserbarhet.

Effekt av saltdannelse på ekstraksjonen var usikker. For å avgjøre effekt av prøvens ionestyrke på ekstraksjonsutbytte ble forskjellige konsentrasjonen av NaCl i området 0-6 mol/L tilsatt prøveløsningen. Resultater viste at utbytte øker ved økning av saltkonsentrasjon. Men NaCl ble ikke løst opp helt i prøveløsningen i konsentrasjon over 5 mol/L. Derfor ble 5 mol/L NaCl tilsatt prøveløsningen i reel prøveekstraksjon.

Effekt av prøveløsningens konsentrasjon på ekstraksjonsutbytte ble også evaluert. Nikotin i konsentrasjonen 10, 20, 50, 100, 500, 5000 og 10000 µg/l ble tilsatt vandig løsning. Med forskjellige konsentrasjoner av prøveløsning ble fem ekstraksjonsenheter klargjort og ekstrahert samtidig i 10 minutter. Resultater viste at oppkonsentrering ble redusert gradvis når prøveløsningens konsentrasjon var høyere enn 5000 µg/l. Forklaringen kan være at mikroekstraksjonssystemet ble delvis overbelastet.

For å evaluere metoden for deteksjon av nikotin fra vandige prøver ble standard kurve etablert og regresjonsligningen ble funnet. Korrelasjonskoeffisienten $r^2 = 0,9998$, LOD = 0,06 µg/L.

Under optimale forhold ble nikotin oppkonsentrert 16,6 ganger når konsentrasjonen var 20 µg/L, RSD (n=6) var 3 % og relativ utbytte ble 98,7 %.

H-U-HF-LPME metoden ble brukt til å ekstrahere nikotin fra plasma. For å evaluere effektiviteten av metoden ble faktorer som ultralydfrekvens og styrke, organisk løsningsmiddelvolum, ekstraksjonstid, ionestyrke av prøveløsningen og prøveløsningens konsentrasjon analysert og optimalisert. Under optimale forhold ble LOD, RSD (n=6), relativt utbytte og oppkonsentreringsfaktor beregnet å være henholdsvis 0,06 µg/L, 3 %, 99,8 % og 16,6 ganger.

Det ble konkludert at metoden er anvendbar for å ekstrahere og analysere nikotin fra plasmaprøver.

Ekstraksjonstiden var på 10 minutter og dette var akseptabelt sammenlignet med andre tradisjonelle metoder som SPE og LLE [12]. Prosedyren var ganske enkel. I tillegg til utstyr for to-fase HF-LPME ble det brukt et ultralydapparat. Dette kompliserte prosedyren

sammenlignet med vanlig to-fase HF-LPME men fordelen var kortere ekstraksjonstid. Ekstraktet var rent og det var ikke spor av urenheter i kromatogrammet. Denne metoden resulterte i ganske høy utbytte (98,7 %) og akseptabel oppkonsentreringsfaktor (opp mot 17 ganger). Forbruk av organiskløsemiddel var veldig lite i denne metoden og kostnad per analyse var lav. Valideringsresultatene var innenfor kravene til FDA guidelines [14]. Korrelasjonskoeffisienten var over 0,99 og RSD verdien var under 15 % med god margin. LOQ er ikke oppgitt i studien men LOD er gitt å være 0,06 ng/ml (0,06 µg/L) som er under terapeutisk konsentrasjon av nikotin[15].

4.2 Tabell

Fra aktuelle artikler som ble brukt i tabellen ble følgende data notert:

- Hvilke legemidler som ble ekstrahert
- Hvilke metode ble brukt for ekstraksjon
- Hvilke prøveløsninger det ble ekstrahert fra
- Hvilket organisk løsemiddel det ble brukt som SLM
- Hvilken akseptorløsning som ble brukt i metoden
- Kjemisk egenskap til legemiddelet
- Hvilket instrument det ble brukt i analysen

Totalt er det listet 120 forskjellige legemidler i tabellen. Følgende gir en kort oppsummering om tabellen:

- Tre-fase HF-LPME er mest brukt som ekstraksjonsmetode i forskjellige studier relatert til legemidler.
- Urin, vandig standardløsning og plasma er de prøveløsninger hvor flest legemidler er blitt ekstrahert fra.
- Vanligste SLM løsemidler er dodecylacetat, 1-oktanol og diheksyleter (dette gjelder to-fase og tre-fase HF-LPME generelt).
- Saltsyre er mest brukt som akseptorfase i tre-fase HF-LPME.
- Vanligste analyseinstrument er CE og HPLC.
- ATC-grupper som N06A (antidepressiva), N05A (antipsykotika), M01A (antiinflammatorisk), N05B (anxiolytika) og C07A (betablokkere) har flere representanter i listen over legemidler som er blitt ekstrahert med LPM

Tabell 10: Oversikt over legemidler og metabolitter som ble ekstrahert ved HF-LPME, hvilke fase, prøveløsning, SLM løsemiddel, akseptorfase, kjemisk egenskap (sur, basisk, nøytral) og instrument ble brukt i analysen.

Legemiddel og metabolitter	Fase	Prøveløsning	Organisk membran	Akseptor fase	Kjemisk egenskap	Instrument	Referanse
17 α -estradiol	to-fase	Melk	1-oktanol	1-oktanol	Nøytral	HPLC	[26]
17 α -etylestradiol	to-fase	Melk	1-oktanol	1-oktanol	Nøytral	HPLC	[26]
17 β -estradiol	to-fase	Melk	Nonanoik syre 1-oktanol	Nonanoik syre 1-oktanol	Nøytral	HPLC	[27],[26]
7-aminoflunitrazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
7-aminoklonazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Amfebutamon	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Amfetamin	tre-fase	Vandig standardløsning Plasma Blod, Urin	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl 0,01 M HCl	Basisk	CE	[11],[29], [30]
Amitriptylin	tre-fase	Vandig standardløsning Blod Urin, Plasma	Dodecylacetat n-dodekan Diheksyleter	0,01 M HCl 0,2 M Maursyre HCl	Basisk	CE HPLC-MS HPLC-UV	[11],[31], [29],[32], [33],[34]
Atenolol	tre-fase	Vandig standardløsning Urin	Dodecylacetat n-oktanol 1-oktanol	0,01 M HCl 0,1 M HCl 0,05 M HCl	Basisk	CE	[11],[29], [35]
Cimetidin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Ciprofloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH12	Zwitterion	HPLC	[36]

Citalopram	to-fase, 3- fase	Plasma Urin Blod Vandig standardløsning Brystmelk	Heksyl eter, Diheksyleter Dodecylacetat, n-oktanol Siloksan Polyfenyl-metylsiloksan	0,02 M fosfsatbuffer 0,01 M HCl 0,1 M HCl 0,01 M fostat n-oktanol	Basisk	CE HPLC GC	[11],[13], [37],[9], [38],[29] ,[39]
Clemastin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Diazepam	to-fase tre-fase	Plasma Urin	n-oktanol butyl acetat 1-oktanol heksyl eter Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	n-oktanol butyl acetat 1-oktanol heksyl eter 3,0 M HCl	Basisk	GC GC-MS	[37],[16], [29],[28]
Dienestradiol	to-fase	Melk	1-oktanol	1-oktanol	Nøytral	HPLC	[26]
Dietylestilbestrol	to-fase	Melk	Nonanoik syre 1-oktanol	Nonanoik syre 1-ottanol	Nøytral	HPLC	[27],[26]
Difenhydramin	tre-fase	Vandig prøveløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Dihydronorketamin	tre-fase	Urin	Eukalyptus olje	1,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[40]
Diklofenak	tre-fase	Urin	Diheksyleter	NaOH pH 12,5 NaOH pH 8-13	Sur	HPLC HPLC/MS-MS	[18],[41]
Diksyrazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Diltiazem	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Doksepin	tre-fase	Vandig standardløsning Blod	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl 0,2 M maursyre	Basisk	CE HPLC-MS HPLC-UV	[11],[31], [29],[33], [34]

Doksysykin	tre-fase	Brystmelk Plasma	1-oktanol	0,1 M H ₃ PO ₄ + 1 M NaCl	Basisk	HPLC	[19]
Danofloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
Efedrin	tre-fase	Plasma Urin	TEHP(tris(2-etylheksyl)fosfat)	0,001 M HCl	Basisk	EME	[42]
Enrofloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
Esteriol	to-fase	Melk	1-oktanol	1-oktanol	Nøytral	HPLC	[26]
Estron	to-fase	Melk	Nonanoik syre 1-oktanol	Nonanoik syre 1-oktanol	Nøytral	HPLC	[27],[26]
Fenylpropanolamin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Flufenazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Flufentiksol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Flumequin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Sur	HPLC	[36, 43]
Flunitrazepam	to-fase tre-fase	Plasma Urin	1-oktanol Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	1-oktanol 3,0 M HCl	Basisk	GC /MS	[44],[28]
Fluoksetin	tre-fase	Vandig standardløsning Blod	Dodecylacetat	0,01 M HCl 0,2 M Maursyre	Basisk	CE	[11],[29]
Fluvoksamin	tre-fase	Vandig standardløsning Brystmelk Blod	Dodecylacetat Siloksan Polyfenyl-metylsiloksan	0,01 M HCl 0,2 M Maursyre	Basisk	CE	[11],[29], [39]
Gatifloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
Grepafloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
Haloperidol	tre-fase	Vandig standardløsning Plasma, Urin	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11],[29]

Heksestrol	to-fase	Melk	1-oktanol	1-oktanol	Nøytral	HPLC	[26]
Hydralazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Ibuprofen	tre-fase	Urin	Diheksyleter	NaOH pH 12,5 NaOH pH 8-13	Sur	HPLC HPLC/MS-MS	[18],[41], [45],[29]
Imipramin	tre-fase	Plasma Urin	n-dodekan	0,01 M HCl	Basisk	HPLC-UV	[32]
Kabergolin	tre-fase	Plasma Blod, Urin	n-oktanol	Ukjent	Basisk	HPLC	[46]
Ketamin	tre-fase	Urin	Eukalyptus olje	1,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[40]
Ketoprofen	tre-fase	Urin	Diheksyleter	0,1 M NaOH	Sur	CE	[29]
Klomipramin	tre-fase	Vandig standardløsning Blod	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl 0,2 M Maursyre	Basisk	CE HPLC-MS HPLC-UV	[11],[31], [29],[33], [34]
Klonazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Klorcyklizin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Klordiazepoksid	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Klorprotiksen	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Klorpromazin	to-fase tre-fase	Plasma Urin Blod Vandig standardløsning	Dodecylacetat n-dosekan	0,01 M HCl	Basisk	CE HPLC	[11],[47]
Klozapin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]

Kodein	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Kokain	to-fase	Urin, Spytt	Kloroform	Kloroform	Basisk	GC	[29]
Levomepromazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Levonorgestrel	tre-fase	Urin	n-dodekan	Metanol	Nøytral	HPLC	[48]
Lidokain	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Loperamid	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Lorazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Marbofloksasin	tre-fase	Urin	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
MBDB	tre-fase	Blod, Urin	Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	FIA-APCI-MS- MS	[29]
MDA	tre-fase	Blod, Urin	Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	FIA-APCI-MS- MS	[29]
MDEA	tre-fase	Blod, Urin	Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	FIA-APCI-MS- MS	[29]
MDMA	tre-fase	Blod, Urin	Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	FIA-APCI-MS- MS	[29]
Medazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Megestrol acetat	tre-fase	Urin	n-dodekan	Metanol	Nøytral	HPLC	[48]
Meklizin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Mepyramin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Metadon	to-fase tre-fase	Vandig standardløsning Plasma Urin	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl Diheksyleter	Basisk	CE GC	[11],[29], [30]

Metamfetamin	to-fase, 3- fase	Urin Plasma Blod Vandig standardløsning	1-oktanol Heksyl eter, Dodecylacetat n-oktanol Diheksyleter	0,1 M HCl 0,01M HCl 0,01 M fostat n-oktanol	Basisk	CE HPLC GC	[11],[37], [9], [6],[29]
Metformin	tre-fase	Plasma, Urin	Diheksyleter	0,1 M HCl	Basisk	HPLC	[24],[49]
Mianserin	tre-fase	Plasma Brystmelk Vandig standardløsning Blod	di-n-heksyl eter, Dodecylacetat Diheksyleter, Siloksan Polyfenyl-metylsiloksan	0,01 M HCl 0,01M HCl 0,2 M Maursyre	Basisk	CE HPLC-MS HPLC-UV	[11],[50], [31],[29], [39], [33], [34]
Moklobemid	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
N-desmetylcitalopram	to-fase, 3- fase	Plasma	Heksyl eter, n-oktanol	20mM forstafbuffer 0,1 M HCl 0,01 M fostat n-oktanol	Basisk	CE HPLC GC	[13],[37], [38]
N-desmetyldiazepam	to-fase	Plasma Urin	butyl acetat 1-oktanol heksyl eter	butyl acetat 1-oktanol heksyl eter	Basisk	GC	[37],[16]
Naproxen	3- fase	Urin	n-oktanol Diheksyleter	0,02 M NaOH 0,1 M NaOH	Sur	CE	[37],[29]
Nefazodon	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Nikotin	to-fase	Plasma	n-oktanol	n-oktanol	Basisk	GC-FID	[25]
Nitrazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Nordiazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]

Norefedrin	tre-fase	Urin	n-oktanol 1-oktanol	0,1 M HCl 0,05 M HCl	Basisk	CE	[29],[35]
Norfloksasin	tre-fase	Urin,	1-oktanol	Vandig løsning pH 12	Zwitterion	HPLC	[36]
Norketamin	tre-fase	Urin	Eukalyptus olje	1,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[40]
Nortriptylin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	CE HPLC-MS HPLC-UV	[11],[34]
Oksazepam	tre-fase	Urin	Diheksyleter: 1-onanol (9:1)	3,0 M HCl	Basisk	GC-MS	[28]
Oksytetrasyklin	tre-fase	Brystmelk Plasma	1-oktanol	0,1 M H ₃ PO ₄ + 1 M NaCl	Basisk	HPLC	[19]
Olanzapin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Paroksetin	tre-fase	Brystmelk Blod Vandig standardløsning	Dodecylacetat Polyfenyl-metylsiloksan	0,01 M HCl 0,2 M Maursyre 0,01 M HCl	Basisk	CE	[11],[29], [39]
Petidin	tre-fase	Vandig standardløsning Plasma	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11],[29] ,[30]
Pimozid	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Pindolol	tre-fase	Urin	n-oktanol 1-oktanol	0,1 M HCl 0,05 M HCl	Basisk	CE	[29],[35]
Practolol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Prazepam	to-fase	Plasma Urin	n-oktanol butyl acetat 1-oktanol heksyl eter	n-oktanol butyl acetat 1-oktanol heksyl eter	Basisk	GC	[37],[16], [29]

Prefenazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Proklorperazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Prometazin	to-fase tre-fase	Vandig standardløsning Plasma Urin	Dodecylacetat Diheksyleter	0,01 M HCl Diheksyleter	Basisk	CE GC	[11],[29], [30]
Propanolol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Quetiapin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Ranitidin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Reboksetin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Reserpin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Risperidon	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Rosiglitazon	tre-fase	Plasma Urin	Diheksyleter	0,1 M HCl	Zwitterion	HPLC	[49]
Salisylsyre	tre-fase	Urin	Diheksyleter	NaOH pH 12,5 NaOH pH 8-13	Sur	HPLC HPLC/MS-MS	[18],[41]
Sertralin	tre-fase	Vandig standardløsning Plasma, Urin	Dodecylacetat n-dodekan	0,01 M HCl HCl	Basisk	CE HPLC-UV	[11],[32]
Sotalol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Terfenadin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Tetrahydrokanna- Binolkarboksylsyre	to-fase	Urin	n-oktan	n-oktan	Sur	GC	[29]
Tetrasyklin	tre-fase	Brystmelk Plasma	1-oktanol	0,1 M H ₃ PO ₄ + 1 M NaCl	Basisk	HPLC	[19]
Timolol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Tioridazin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]

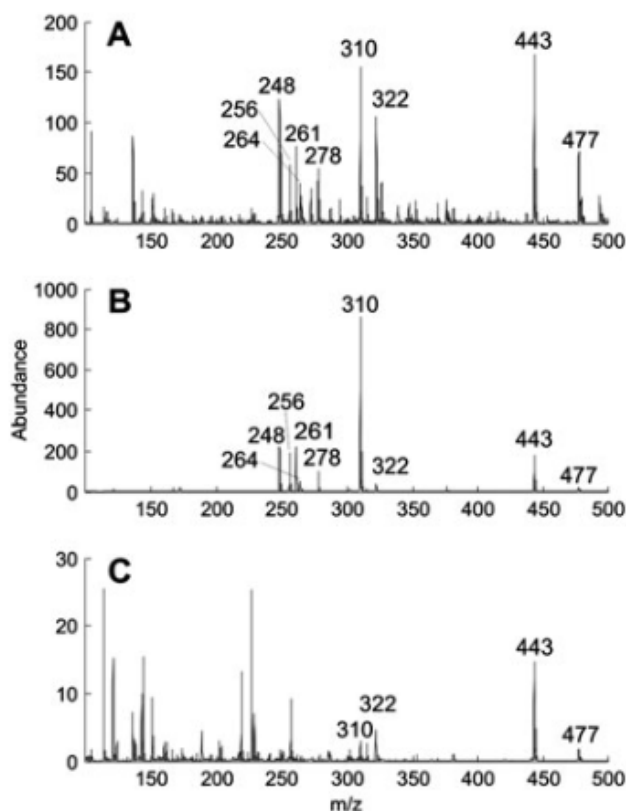
Tramadol	tre-fase	Plasma Urin	n-dodekan	Acetonitril	Basisk	GC-MS	[51]
Trimetoprim	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Trimipramin	tre-fase	Blod	Dodecylacetat	0,2 M Maursyre	Basisk	-----	[29]
Tyroksin	tre-fase	Serum	1-oktanol	Ammoniakk løsning	Zwitterion	LC-MS/MS	[52]
Valerina syre	tre-fase	Vandig standardløsning	Diheksyleter	Vandig løsning pH 9,5	Sur	HPLC/UV	[17]
Venlafaksin	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01M HCl	Basisk	CE	[11]
Verapamil	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]
Warfarin	tre-fase	Plasma	1-oktanol	NaOH	Sur	HPLC-UV	[53]
Zuklopentiksol	tre-fase	Vandig standardløsning	Dodecylacetat	0,01 M HCl	Basisk	CE	[11]

4.3 Utvikling og framtidsutsikt

Gjennom årene er det foreslått flere metoder for å forbedre og automatisere hullfiber HF-LPME.

I et forsøk ble HF-LPME i kombinasjon med DESI-MS (*desorption electrospray ionization mass spectrometry*) brukt for første gang for deteksjon og analyse av basiske stoffer fra urin [54]. Basiske legemidler som difenhydramin, petidin, nortriptylin og metadon ble brukt som modellsubstanser for studien og massespektrometeret ble operert i full skann modus.

Akseptorløsningen ble brukt i analysen og resultatet ble sammenlignet med analyse hvor HF-LPME ikke ble brukt som oppkonsentreringsmetode. Resultater viste at tre-fase HF-LPME hadde effektivt oppkonsentrert målestoffer fra urinprøven og gjorde deteksjonen mulig for flere basiske stoffer ved DESI-MS.



Figur 22: Sammenligning av to-fase HF-LPME (A), tre-fase HF-LPME (B) og ikke fortynnet

urin. Alle tilsatt syv basiske komponenter. Signal av protonert molekyl $[M + H]^+$:

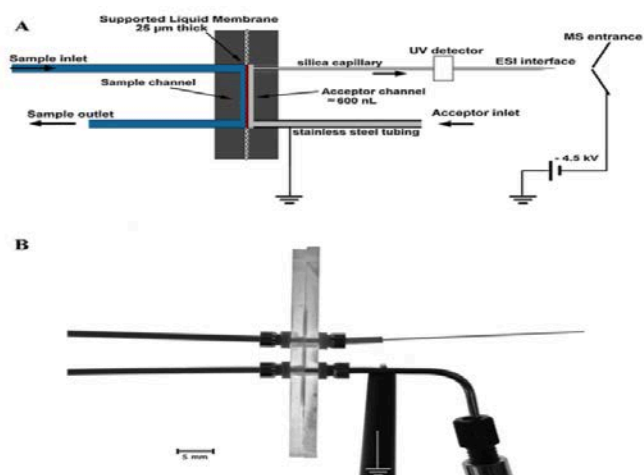
petidine m/z 248, diphenhydramine m/z 256, diphenhydramine-d₅ m/z 261, nortriptyline m/z 264, ami-triptyline m/z 278, methadone m/z 310, dye solution m/z 322 and m/z 443, and loperamide m/z 477 [54].

Hullfiber HF-LPME gjorde det mulig å identifisere basiske stoffer i konsentrasjonsområdet 25-100 ng/ml, og identifikasjon ble funnet å være pålitelig siden alle prøver tilsatt analytt i konsentrasjon høyere enn identifiseringsgrensen ble detektert [54].

For første gang ble HF-LPME direkte koblet til DESI-MS for ekstraksjon og analyse av basiske legemidler. I denne metoden var ekstraksjonstiden 30 minutter.

Valideringsresultatene viser RSD verdier fra 0,2 % - 22,9 %, LOQ ca. 140 ng/ml, $R^2 = 0,992$ i området 50-2000 ng/ml. Standardavvik på 0,2 % viser at metoden har god presisjon for å måle legemidler i lave konsentrasjoner. Prøverensning er spesiell viktig ved direkte massespektrometri uten kromatografisk separasjon og derfor er tre-fase HF-LPME et godt alternativ. Ekstraksjonstiden i denne metoden er noe lang og selv om muligheten for å ekstrahere flere prøveløsninger samtidig er til stede, ville en kortere ekstraksjonstid være en fordel.

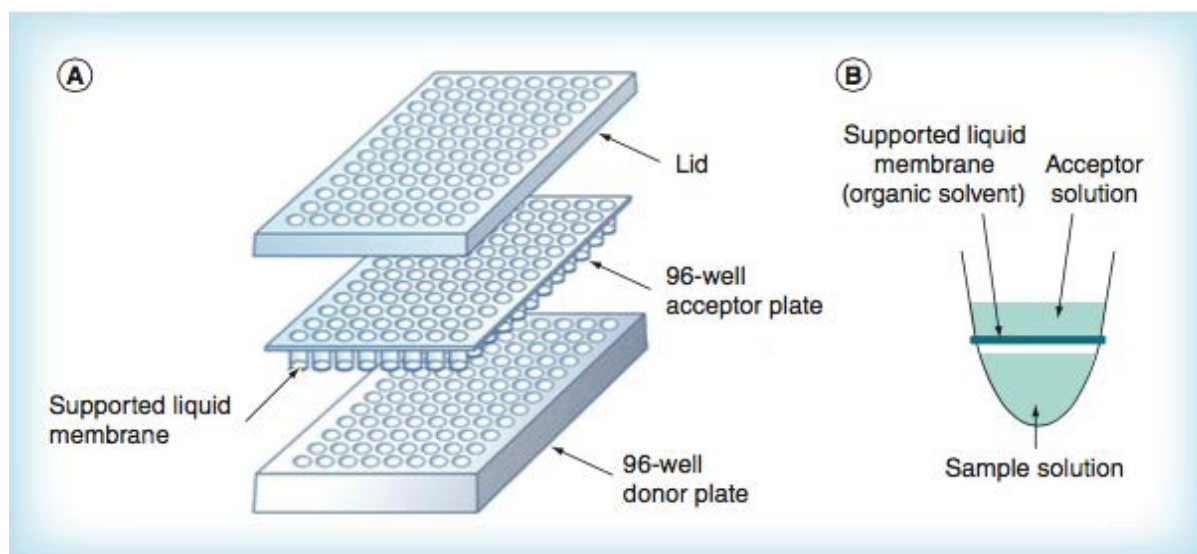
En annen metode som kan nevnes er bruk av mikrofluid-chip basert HF-LPME til oppkonsentrering og prøverensning for små volum av prøver [55]. I denne metoden ble prøveløsningen pumpet inn i en HF-LPME-chip ved hjelp av en mikrosprøyte med en flow-hastighet på 3-4 $\mu\text{l}/\text{min}$. På innsiden av HF-LPME-chip (brønnen) var prøveløsningen i direkte kontakt med SLM (0,2 μl dodecylacetat) som var immobilisert i porene til en flat membran av polypropylen. Etter SLM var akseptorfasen tilgjengelig. Akseptorfasen ble enten pumpet inn med en hastighet på 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ under ekstraksjon eller holdt stillestående (stop-flow). Akseptorfasen ble enten analysert off-line med kapillærelektroforese for eksakt kvantifisering eller on-line ved UV deteksjon eller elektrospray-ionisering massespektrometri for tidsprofiler og konsentrasjonsbestemmelser.



Figur 23: Skjematisk illustrasjon av HF-LPME-chip (A) bilde av HF-LPME-chip (B) [55]

Dette konseptet viser at HF-LPME kan automatiseres og tilpasses moderne mikro-chip teknologi. En fordel med dette konseptet er at både prøveløsningen og akseptorløsningen kan pumpes inn og ut av chipen i løpet av ekstraksjonen. Dermed vil det være mulig å ekstrahere flere prøver etter hver andre, og hvis nødvendig kan akseptorløsningen og det organiske løsemiddelet lett endres. En annen fordel er at systemet gjør det mulig å oppkonsentrere selv fra små prøvevolum. Valideringsresultatene viser utbytter fra 52-91 % og RSD verdier fra 2-6 %. Etter 10 minutter ekstraksjon ble det oppnådd 42 ganger oppkonsentrering og etter 120 minutter ble oppkonsentreringen 500 ganger fra en 320 µl prøveløsning.

I 2013 presenterte Pedersen-Bjergaard, Rasmussen, Parmer og Gjelstad [10] en modifisert metode basert på HF-LPME som kan lett automatiseres. Metoden heter *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME). Denne metoden er en mikronisert væske-væske-væskeekstraksjon som finner sted i 96-brønns format. Metoden er slik at en donorplate og en akseptorplate danner en *sandwich* hvor prøveløsningen og akseptorløsningen er separert ved hjelp av en kunstig væskemembran. Figur 24 viser hvordan apparatet settes sammen [10].



Figur 24: Prinsippskisse for PALME

- A) Nederste plate inneholder prøveløsningen, midterste plate inneholder akseptorløsningen og øverste plate hindrer fordamping. B) Skjematisk bildet av en enkelt brønn [10]

Først ble prøveløsninger som hadde en volum på 200 µl pipettert inn i 96-brønns donor platen. Prøveløsningen var enten plasmaprøver (som hadde blitt tilsatt modellsubstans eller reelle prøver) eller prøver av 4 modellsubstanser (petidin, nortriptylin, metadon og haloperidol) løst i rent vann. Etterpå ble 200 µl NaOH pipettert inn i hver brønn for å gjøre miljøet alkalisk. En plate av porøs polypropylen membran ble plassert på toppen av hver

prøveløsning. 2 µl diheksyleter ble pipettert ut på hver membran for å lage en kunstig væske membran. Etter omtrent ett minutt var den organiske væsken immobilisert inn i porene til membranen. Deretter ble akseptorplaten plassert på toppen av membranen og hele enheten ble presset sammen og holdt på plass ved bruk av teip. Tilslutt ble akseptorplaten fylt med 50 µl 20 mM HCOOH ved hjelp av en pipette. Hele oppsettet ble plassert på en vibrator og ble omrørt ved 900 rpm. Etter at ekstraksjonen var over ble akseptorløsningen samlet opp og overført til en vial og analysert ved LC-MS/MS. Metoden ble optimalisert ved å undersøke effekten av forskjellige organiske løsemidler, forskjellige volum av prøveløsningen, forskjellige akseptorløsninger, forskjellige omrøringshastigheter og ekstraksjonstider. Metoden er egnet for ekstraksjon og analyse av små prøvevolum av plasma og målet er fullautomatisering av konseptet i nær framtid.

PALME konseptet er det nærmeste HF-LPME har kommet fullautomatisering.

Ekstraksjonstiden i denne metoden var 45 minutter, men siden 96 prøver kan ekstraheres samtidig blir prøvegjennomstrømningen og effektiviteten svært høy. Ekstraksjonsutbyttene i PALME varierte fra 34-74 % for de utvalgte legemidlene og RSD verdiene var alle under 12 %. Lineariteteten var bedre enn 0,9955 og LOQ for analyttene var i område 0,01-0,35 ng/ml. Forbruket av organiske løsningsmiddel var svært lav per prøve sammenlignet med andre prøveopparbeidelsesmetoder. Ekstraktet fra PALME var kompatibel med LC-MS/MS. Kostnaden per analyse i denne metoden var lav.

5 Diskusjon

For at en ny ekstraksjonsmetode skal finne sin plass i framtidens laboratorier skal denne metoden kunne konkurrere med tradisjonelle analyse metoder som væske-væske ekstraksjon, fast-fase ekstraksjon og proteinfelling. Disse metodene har vært i bruk i flere tiår og er godt tilpasset analyseinstrumentene som brukes i dag. Analyse av legemidler og illegale stoffer i dag er annerledes enn før. Det finnes hundrevis av legemidler med forskjellige kjemiske egenskaper som brukes i helsevesenet. Når det gjelder illegale stoffer er bruken av slike stoffer i doping for eksempel mye mer komplisert enn det var for 50 år siden. Mange stoffer brukes i små mengder, og dermed kreves følsomme analyseinstrumenter for å oppdage dem. Erfaringen viser at det kommer flere legemidler og illegale stoffer i framtiden som krever mer følsomme ekstraksjonsmetoder og analyseinstrumenter for å bli detektert.

I tillegg er ofte prøvemengdene små og det kreves effektive metoder for å kunne ekstrahere stoffer i lave konsentrasjoner fra små prøveløsninger. Dermed er det spesielt viktig at oppkonsentreringen og utbytte i en metode er høye.

Basert på dagens utfordringer vil målet med å presentere bioanalytiske metoder basert på et nytt prøveopparbeidelseskonsept blant annet være:

- 1- metoden skal kunne tilby selektiv ekstraksjon av stoffer
- 2- prosedyren skal være enkel
- 3- ekstraksjonsresultatene skal være minst like bra sammenlignet med tradisjonelle metoder
- 4- kostnader per analyse skal være lavere
- 5- kjemikalier og reagenser knyttet til metoden skal være mindre toksiske for miljøet og personalet
- 6- metoden skal kunne tilpasses analyseinstrumenter og dagens laboratorier
- 7- skal kunne automatiseres
- 8- valideringsresultater skal være innenfor kravene som stilles til bioanalytiske metoder

Proteinfellingsprosedyren tar ofte ikke lang tid, men ekstraktet er ikke spesielt rent.

Mengde løsningsmiddel som brukes i denne metoden er i ml skala og avhengig av volumet til prøveløsningen. LLE- og SPE- metoder bruker typisk opp mot 10 minutter per ekstraksjon og ekstraksjonsutbyttene er ofte høye [12]. Når det gjelder renhet får man

rene ekstrakt etter LLE og ganske rene ekstrakt med SPE. Typisk forbruk av løsemiddel per ekstraksjon er i området 2-5 ml for SPE og 2-10 ml for LLE [12]. Hvis HF-LPME sammenlignes med overnevnte metoder ser man at ekstraksjonstiden er ofte lengre i HF-LPME med unntak av når strøm brukes i analysen (EME metoden). En gjennomgang av resultatene fra artiklene som er nevnt i denne oppgaven viser at utførelse av HF-LPME resulterer i:

- 1- betydelig lavere forbruk av organisk løsningsmiddel
- 2- reduksjon i kostnad per analyse
- 3- god nøyaktighet vises i de fleste studier som er gjennomgått
- 4- meget høy oppkonsentrering av analytter fra prøveløsningen
- 5- betydelig rene ekstrakter
- 6- akseptabelt høye utbytter i mange studier
- 7- LOQ og LOD er ofte under terapeutiske konsentrasjoner for legemidler
- 8- metoden er enkel å gjennomføre.

Selv om HF-LPME leverer gode resultater i flere punkter finnes også utfordringer for metoden. Som nevnt tidligere er ekstraksjonstiden ganske lang, og dette byr på utfordringer i dagens analyselaboratorier når effektivisering er en viktig. Og spesielt viktig når mange prøver skal analyseres samtidig i store laboratorier. Derfor er behovet for automatisering av metoden så viktig. Per i dag finnes det få publiserte artikler om automatisering av HF-LPME. Dette tyder på at automatisering av HF-LPME er utfordrende. Det arbeides med løsninger for dette, men løsningene er ikke fullkomne ennå. Tilgang til kommersielt utstyr og markedsføring av metoden er også viktig for at metoden skal kunne overleve. Foreløpig er det et firma som markedsfører utstyr som passer metoden. Firmaet heter Biomix. Nettsiden til biomix fungerer ikke helt og er vanskelig å vite i hvilke grad nettsiden er aktiv. Det kan tenkes at fremtiden for HF-LPME avhenger av å finne løsninger for reduksjon av ekstraksjonstiden, automatiseringen av metoden, salg av kommersielt utstyr og markedsføring av metoden. HF-LPME har potensialet til å bli en viktig ekstraksjonsmetode for rutinelaboratorier. Konseptet ble presentert for 16 år siden og har fremtiden for seg.

6 Konklusjon

Gjennomgang av studier og vitenskapelige litteratur viser at HF-LPME som analysekonsept kan finne sin plass i fremtidens laboratorium. Metoden har stor internasjonal interesse, og publiserte artikler fra forskjellige deler av verden viser at metoden allerede er utbredt og blir forsket mye på. HF-LPME har flere positive egenskaper som rene ekstrakter, høy oppkonsentrering av analytter, ofte høyt utbytte, lave kostnader per analyse og betydelig reduksjon i bruken av organiske løsemidler. På en annen side er lange ekstraksjonstider og vanskeligheter med automatisering hovedutfordringer ved dette konseptet. Hvor stor utbredelse HF-LPME vil få i framtidens laboratorieanalyser er i hovedsak avhengig av å finne løsninger på disse utfordringene.

Frem til nå har mange legemidler blitt ekstrahert ved HF-LPME og resultatene er publisert i internasjonale tidsskrifter. HF-LPME er blitt brukt i kombinasjon med flere andre analysemetoder til å ekstrahere stoffer med forskjellige egenskaper og resultatene er lovende. Arbeid med fullautomatisering av HF-LPME er allerede i gang og målet er å kunne bruke konseptet til å utføre flere ekstraksjoner samtidig. Konseptet PALME bruker grunnleggende prinsipper fra HF-LPME, og muliggjør automatisering ved hjelp av en 96-brønn plate. Resultatene er lovende.

Resultatet av arbeidet med masteroppgaven er basert på min forståelse av HF-LPME og min oppfatning av relevante artikler som er publisert i internasjonale tidsskrift.

Referanseliste

1. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
2. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 1-10.
3. Pedersen-Bjergaard, S., K. Rasmussen, and J. Jönsson, *Liquid-Phase Microextraction (LPME) Utilizing Porous Hollow Fibers*, in *Handbook of sample preparation*. ed., J.P.H.L.L. Hoboken, Editor. 2010, Wiley. p. 125-148.
4. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget. p. 275-285.
5. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(2): p. 235-239.
6. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
7. Gjelstad, A., et al., *Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode - Practical Considerations*. Lc Gc Europe, 2011. **24**(12): p. 633-641.
8. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 132-142.
9. Gronhaug Halvorsen, T., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **760**(2): p. 219-226.
10. Gjelstad, A., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
11. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs--selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. J Sep Sci, 2005. **28**(11): p. 1195-1203.
12. Hansen, S.H. and S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. 2015: : Wiley.
13. Andersen, S., et al., *Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction*. J Pharm Biomed Anal, 2003. **33**(2): p. 263-273.
14. U.S. Food and Drug Administration. 2015; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>.
15. Schulz, M. and A. Schmoldt, *Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics*. Pharmazie, 2003. **58**(7): p. 447-74.
16. Ugland, H.G., M. Krogh, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **749**(1): p. 85-92.

17. Mirzaei, M. and H. Dinpanah, *Three phases hollow fiber LPME combined with HPLC-UV for extraction, preconcentration and determination of valerianic acid in Valeriana officinalis*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011. **879**(21): p. 1870-1874.
18. Payan, M.R., et al., *HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME)*. Analytica Chimica Acta, 2009. **653**(2): p. 184-190.
19. Shariati, S., Y. Yamini, and A. Esrafil, *Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2009. **877**(4): p. 393-400.
20. Ouyang, G., W.N. Zhao, and J. Pawliszyn, *Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2007. **1138**(1-2): p. 47-54.
21. Tao, Y., et al., *Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(35): p. 6259-6266.
22. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
23. Zhou, J., et al., *Application of two-phase hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the study of the echinacoside pharmacokinetics in Parkinson's disease rat plasma*. J Pharm Biomed Anal, 2013. **81-82**: p. 27-33.
24. Ben-Hander, G.M., et al., *Hollow fiber liquid phase microextraction with in situ derivatization for the determination of trace amounts of metformin hydrochloride (anti-diabetic drug) in biological fluids*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2013. **941**: p. 123-130.
25. Liu, X.T., et al., *High-Throughput Determination of Nicotine in Plasma by Ultrasonication Enhanced Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Prior to Gas Chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 2014. **52**(6): p. 553-558.
26. Socas-Rodriguez, B., et al., *Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples*. Journal of Chromatography A, 2013. **1313**: p. 175-184.
27. Wang, P.J., et al., *Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples*. Food Chemistry, 2015. **172**: p. 385-390.
28. de Bairros, A.V., et al., *Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2015. **975**: p. 24-33.
29. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **817**(1): p. 3-12.
30. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-613.
31. Bardstü, K.F., et al., *Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME) - Practical considerations in the three-phase mode*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(9): p. 1364-1370.

32. Esrafil, A., Y. Yamini, and S. Shariati, *Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **604**(2): p. 127-133.
33. Halvorsen, T.G., et al., *Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry - Rapid screening of amphetamines from biological matrices*. *Journal of Separation Science*, 2001. **24**(7): p. 615-622.
34. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **592**(1): p. 1-8.
35. Hou, L., et al., *Combination of liquid-phase microextraction and on-column stacking for trace analysis of amino alcohols by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **979**(1-2): p. 163-169.
36. Payan, M.R., et al., *Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011. **55**(2): p. 332-341.
37. Rasmussen, K.E., et al., *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr A*, 2000. **873**(1): p. 3-11.
38. Halvorsen, T.G., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **909**(1): p. 87-93.
39. Bjorhovde, A., et al., *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **491**(2): p. 155-161.
40. de Baires, A.V., et al., *Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane*. *Forensic Science International*, 2014. **243**: p. 47-54.
41. Payan, M.R., et al., *Application of hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewaters*. *Talanta*, 2010. **82**(2): p. 854-858.
42. Fotouhi, L., et al., *Comparison of conventional hollow fiber based liquid phase microextraction and electromembrane extraction efficiencies for the extraction of ephedrine from biological fluids*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(48): p. 8581-8586.
43. Ocana-Gonzalez, J.A., et al., *Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the direct determination of flumequine in urban wastewaters by flow-injection analysis with terbium-sensitized chemiluminescence*. *Journal of Separation Science*, 2014. **37**(19): p. 2738-2744.
44. Cui, S.F., et al., *Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(12): p. 2241-2247.
45. Payan, M.R., et al., *Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of ibuprofen followed by FIA-chemiluminescence determination using the acidic permanganate-sulfite system*. *Talanta*, 2009. **79**(3): p. 911-915.
46. Pirooz, F., et al., *HOLLOW FIBER LIQUID PHASE MICROEXTRACTION COMBINED WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR PRECONCENTRATION AND DETERMINATION OF CABERGOLINE IN*

- BIOLOGICAL SAMPLES*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013. **37**(5): p. 760-771.
47. Sobhi, H.R., Y. Yamini, and R.H. Abadi, *Extraction and determination of trace amounts of chlorpromazine in biological fluids using hollow fiber liquid phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 2007. **45**(5): p. 769-774.
 48. Tajik, M., et al., *Automated hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for the extraction of two hormonal drugs*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **107**: p. 24-31.
 49. Ben-Hander, G.M., et al., *Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids*. Talanta, 2015. **131**: p. 590-596.
 50. Andersen, S., et al., *Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 303-312.
 51. Ghambarian, M., Y. Yamini, and A. Esrafil, *Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tramadol in urine and plasma samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **56**(5): p. 1041-1045.
 52. Yong, S.R., et al., *Determination of total thyroxine in human serum by hollow fiber liquid-phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Talanta, 2014. **126**: p. 163-169.
 53. Hadjmohammadi, M. and H. Ghambari, *Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of warfarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **61**: p. 44-49.
 54. Thunig, J., et al., *Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(2): p. 133-140.
 55. Payan, M.D.R., et al., *Liquid-phase microextraction in a microfluidic-chip - High enrichment and sample clean-up from small sample volumes based on three-phase extraction*. Analytica Chimica Acta, 2012. **735**: p. 46-53.